

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 9147 PCT / Me	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 06313	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 05/07/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 05/07/1999
Anmelder GÖPFERICH, Achim		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C08G63/664 C08G81/00 A61L27/18 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C08G A61L A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 844 269 A (KATAOKA KAZUNORI) 27. Mai 1998 (1998-05-27) Ansprüche 1-10	1-19
X	WO 95 03356 A (GREF RUXANDRA ; DOMB ABRAHAM J (IL); PERACCHIA MARIA TERESA (IT); M) 2. Februar 1995 (1995-02-02) Ansprüche 1-42	1-19



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Decocker, L

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06313

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0844269 A	27-05-1998	AU 6631096 A	05-03-1997
		BR 9610053 A	06-07-1999
		CA 2229068 A	20-02-1997
		CN 1192759 A	09-09-1998
		HU 9900662 A	28-06-1999
		WO 9706202 A	20-02-1997
		NO 975584 A	03-12-1997
		SI 9620107 A	31-10-1998
		US 5929177 A	27-07-1999
WO 9503356 A	02-02-1995	US 5565215 A	15-10-1996
		US 5543158 A	06-08-1996
		US 5578325 A	26-11-1996
		CA 2167920 A	02-02-1995
		CA 2167921 A	02-02-1995
		EP 0710261 A	08-05-1996
		EP 0712421 A	22-05-1996
		JP 9504308 T	28-04-1997
		JP 9504042 T	22-04-1997
		WO 9503357 A	02-02-1995

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[AMENDED PAGES]

In EP 0 844 269 a block polymer with functional groups at both ends is described, wherein the block polymer is composed from hydrophobic and hydrophilic blocks.

The hydrophilic blocks in this case carry as functional groups amino, carboxyl or mercapto groups, which have to be firstly activated for a covalent linkage of surface-modifying molecules of interest, which generally have amino, mercapto, hydroxyl groups or double bonds as functional groups.

In WO 95/03356, non-linear block copolymers are described which are composed from a multifunctional polymer, to which hydrophilic and hydrophobic polymers are bonded. In this case a possible covalent bonding of modifying substances is likewise achieved via a terminal hydroxyl group of the hydrophilic block, e.g. of polyethylene glycol, which requires previous activation.

The examples outlined above show the need for biodegradable polymers which have the following properties:

1. Adequate masking of the polymer surface for the suppression of non-specific adsorption of substances;
2. Suppression of non-specific adhesion of living cells;
3. Full biodegradability and biocompatibility of the degradation products;
4. Adjustability of the concentration of functional groups on the polymer surface, which are suitable for the chemical reactions with a plurality of surface-modifying substances;
5. Provision of the possibility of coating the polymer surface with several different substances;
6. to permit binding of the surface-modifying substances before or after processing to shaped bodies (e.g. films, porous sponges, microparticles, nanoparticles, micelles etc.), and

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. Formation of patterns by binding surface-modifying substances on the polymer surface.

Two preconditions must be met in order to permanently anchor surface-modifying substances on polymer surfaces:

1. On their surface the polymers must carry functional groups to which the substances may be chemically bonded.
2. The functional groups must be readily accessible for these chemical reactions.

While known biodegradable polymers such as poly(α -hydroxyesters) [e.g. poly(lactide), poly(lactide-co-glycolide)], polyanhydrides or poly(β -hydroxyesters) have suitable functional groups at both molecule ends, these groups are only accessed on the surface with difficulty.

Poly(lactide), for example, has an alcohol and a carboxylic acid function as end group which do not, however, permit binding to the polymer surface for the reasons given above.

To achieve the aforementioned objects, a block copolymer is provided according to the invention containing
a hydrophobic biodegradable polymer a),
a hydrophilic biocompatible polymer b),
at least one reactive group c) for covalent binding of a surface-modifying substance d) to the hydrophilic polymer b), wherein the at least one reactive group c) is an at least bifunctional molecule with at least one free functional group.

According to a further aspect, the invention relates to a surface-modified block copolymer which has as additional component a surface-modifying substance d) bonded by means of the reactive group c) as binding link, and a process for the production thereof.

In a preferred configuration, the block copolymers are present as shaped bodies.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The invention further relates to the application of the block copolymers in particular in the field of drug delivery, drug targeting, and preferably for tissue engineering.

According to a further aspect the invention relates to a process for the production of a block copolymer, wherein the binding of the at least one substance d) to the surface of the block copolymer is achieved by generating a substrate pattern, and the reactive group c) is selected from 1) an at least bifunctional molecule with at least one free functional group and/or 2) a functional group, and block copolymers obtainable with this.

Because of their structure comprising a hydrophobic and a hydrophilic component, the block copolymers according to the invention have a surfactant-like character. This causes the polymer, e.g. upon contact with an aqueous medium, to be subject to an orientation wherein the hydrophilic component b) is present in enriched form on the polymer surface, and thus allows free accessibility of surface-modifying substances d) to the reactive [...> *previous page 11*]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

should still be capable of passing through the kidneys and can be excreted.

Suitable molar masses preferably lie at 200 to 10 000 Da, particularly preferred at 1 000 to 10 000 Da, in which case, in particular for applications outside a human or animal body, polymers with higher molar masses of up to several million Da may also be used.

Above all, PEG has proved to be particularly suitable to masking a polymer surface against the adsorption of molecules and the adhesion of cells.

Block copolymers composed from the following combinations are particularly preferred according to the invention.

The hydrophobic polymer a) is at least one selected from polylactide, polyglycolide, poly(lactide-co-glycolide). Particularly preferred is a polylactide, e.g. a poly(D,L-lactide), preferably with a molar mass in a range from 1 000 to 100 000, in particular up to 50 000 Da.

The hydrophilic polymer b) is a polyethylene glycol (PEG), wherein polyethylene glycols with a molar mass in a range from 200 to 10 000 Da, in particular 1 000 to 10 000 Da, are particularly preferred.

In principle, the reactive group c) can be any desired functional group or an at least bifunctional molecule, which can form a covalent bond with the selected surface-modifying substance d), with the provision that an at least bifunctional molecule is used as reactive group c) for a block copolymer according to one of Claims 1 to 19.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The reactive group c) can comprise:

- a single functional group (e.g. amino group, carboxyl group) and thus direct activation of the hydrophilic polymer (e.g. activated acid function or epoxide);
- physiological dicarboxylic acids (succinic acid, tartaric acid and variants thereof such as those described in Anderson, G.W. et al. J.Am.Chem.Soc.86 (1964) 1839-1842), which are provided with terminal groups (succinimidyl esters) in order to achieve the formation of one or two acid amide groupings;
- dialdehydes (e.g. glutaric dialdehyde);
- special "molecules" for the selective binding of thiols such as those described in Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996), e.g. N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) or succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC);
- photoreactive crosslinkers such as those described in Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996), e.g. N-hydroxysuccinimidyl-4-acidosalicylic acid (NHS-ASA), sulphosuccinimidyl-2-(p-acidosalicylic amido)ethyl-1,3'-dithiopropionate (SASD);
- splittable crosslinkers such as those described in Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996), e.g. compounds from the above-mentioned groups, which may be split by special reagents e.g. disulphides by hydrogenolysis or by disulphide exchange, glycol groups with periodate (e.g. in the case of tartaric acid), ester groups with hydroxylamine; and
- enzymatically splittable molecules such as corresponding peptides, e.g. the sequence Leu-Gly-Pro-Ala, which can be split from collagenase, or oligosaccharides.

Particularly preferred examples of reactive groups c) are those selected from at least one amino group, hydroxyl group, thiol, carboxylic acid, acid chloride, keto group - and in particular for the subject of Claims 1 to 19 - dicarboxylic acid amide, 3-maleic imidopropionic acid-N-succinimidyl ester and succinimidyl ester.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In principle, the synthesis of the block copolymer according to the invention may be achieved in various ways, in which case conventional methods of polymer chemistry are used. On the one hand, the blocks a) and b) can be synthesised separately and subsequently bonded covalently. Alternatively thereto, it is possible to present a polymer chain and synthesis the missing chain by polymerisation at a polymer chain end. Hence, it is possible, for example, to synthesise block copolymers from poly(D,L-lactide) and poly(ethylene glycol) amine (PLA-PEG-NH₂) by presenting PEG-NH₂ and synthesising the biodegradable PLA chain by ring-opening polymerisation from dilactide on the hydroxy end of the PEG-NH₂. In principle, the reverse procedure is also possible.

In this case, the reactive group c) can already be present in the polymer obtained, as in the above example, or a functional group present in the hydrophilic component b) can be converted or introduced, where needed, for binding the desired surface-modifying substance d) to a suitable reactive group c).

Hence, the block copolymer can be modified with nucleophilic groups by coupling an at least bifunctional molecule, e.g. disuccinimidyl succinate, to a free end group of component b). In the simplest case, this reaction can take place in solution, DMSO, for example, is suitable as solvent in the case of PLA-NH₂. After preparation of the block copolymer, e.g. to form a suitable shaped body, the reaction can also take place on the surface thereof.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

controlled change of the surface properties of the block copolymer according to the invention.

The polymers according to the invention may also be used for diagnostic purposes by binding substances d) to their surface, which form a bond with the molecules to be analysed. The analysed product can then be separated from the sample together with the polymer (e.g. via a suitable shaped body).

The production of a block copolymer according to the invention as well as the subsequent binding of a protein is illustrated below using the example of PEG-PLA to explain the invention in more detail.

1. Example: Production of active SWS-NH-PEG-PLA

a) Synthesis of NH_2 -PEG

Production was conducted in accordance with Yokohama, M. et al. Bioconj. Chem. 3 (1992) 275-276.

The desired amount of ethylene oxide was passed into dry THF in a three-necked flask at -79°C (dry ice + methanol bath) and dissolved therein. The ethylene oxide bottle was weighed after introduction, and thus the presented amount of ethylene oxide was determined. In accordance with the desired molecular weight of the polymer, the calculated amount of 0.5M solution of potassium-bis-(trimethylsilyl) amide in toluene was then added from a dropping funnel.

The reaction mixture was then stirred in the closed three-necked flask at 20°C for 36 hours. The polymer solution thus obtained was dropped into the 12-fold amount of ether, and the precipitated polymer was filtered out. After the polymer obtained was dissolved in THF, a small amount of 0.1N hydrochloric acid was added and the silylamide was thus split. The solution of the finished end thus obtained was stirred for 5 minutes at room temperature and once again passed into ether in order to precipitate the pure polymer [...original page 27]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patent Claims:

1. Block copolymer containing
a hydrophobic biodegradable polymer a),
a hydrophilic polymer b),
at least one reactive group c) for covalent binding of a
surface-modifying substance d) to the hydrophilic polymer
b),
wherein the at least one reactive group c) is an at least
bifunctional molecule with at least one free functional
group.
2. Block copolymer according to Claim 1,
characterised in that
the hydrophobic polymer a) and/or hydrophilic polymer b)
are selected from a linear and/or branched polymer.
3. Block copolymer according to one of the preceding claims,
characterised in that
the hydrophobic polymer a) is at least one polymer
selected from polyester, poly- ϵ -caprolactam, poly- α -
hydroxyester, poly- β -hydroxyester, polyamide,
polyphosphazene, polyanhydride, polydioxanon, polymalic
acid, polytartaric acid, polyorthoester, polycarbonate,
peptide, polysaccharide and protein.
4. Block copolymer according to Claim 3,
characterised in that
the hydrophobic polymer a) is at least one polymer
selected from polylactide, polyglycolide, poly(lactide-
co-glycolide), poly- β -hydroxybutyrate and poly- β -
hydroxyvalerate.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5. Block copolymer according to one of the preceding claims, characterised in that the hydrophilic polymer b) is at least one polymer selected from polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyethylene glycol/polypropylene glycol copolymer, polyethylene glycol/polypropylene glycol/polyethylene glycol copolymer, polybutylene glycol, polyacrylamide, polyvinyl alcohol, polysaccharide, peptide and protein.
6. Block copolymer according to one of the preceding claims, characterised in that the reactive group c) is at least one selected from a dicarboxylic acid amide, 3-maleic imidopropionic acid-N-succinimidyl ester and succinimidyl ester.
7. Block copolymer according to one of the preceding claims, characterised in that the hydrophobic polymer a) is at least one selected from polylactide, polyglycolide and poly(lactide-co-glycolide).
8. Block copolymer according to Claim 7, characterised in that the hydrophilic polymer b) is polyethylene glycol.
9. Block copolymer according to Claim 8, characterised in that the polyethylene glycol has a molar mass in a range of 200 to 10 000 Da.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Claim 20:]

the binding of the at least one substance d) to the surface of the block co-polymer is achieved by generating a substrate pattern, and the reactive group c) is selected from 1) an at least bifunctional molecule with at least one free functional group and/or 2) a functional group.

21. Process according to Claim 20, characterised in that the substance d) is applied with a locally constant or variable concentration by means of the reactive group c) on the surface of a block copolymer containing a hydrophobic component a) and hydrophilic component b).
22. Process according to Claim 20 or 21, characterised in that for binding the reactive group c) and/or the substance d) in a substrate pattern, the surface of the block copolymer is structured by a plotter, an ink jet printer, radiation with light, bombardment with particles, stamping or soft lithography.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figures

Abb. = Abbildung = Figure

Figure 2

bioabbaubares Polymer = biodegradable polymer

nicht bioabbaubares bzw. = non-biodegradable or slowly bio-
langsam bioabbaubares degradable polymer
Polymer

Bindeglied = binding link

Oberflächenmodifizierende
Substanz = surface-modifying substance

Figure 5

Foetales Rinderserum = foetal cow serum

Bindung = bond

Figure 6a

Atriales Natriuretisches

Peptid = atrial natriuretic peptide

Bindung = bond

Figure 6b

Lachs - Calcitonin = salmon - calcitonin

Figure 7

nach .. Stunden = after .. hours

Figure 9

Farbstoffmenge = amount of dye

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 10

aktives Polymer .

= active polymer

Glas

= glass

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 22 NOV 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 9147 PCT / Me	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06313	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 05/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 05/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C08G63/664		
Anmelder GÖPFERICH, Achim et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 13 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 02/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Feldmann, G Tel. Nr. +49 89 2399 8300 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-7, 11-17, 20, 21, ursprüngliche Fassung
23, 24, 26-33

8, 8a, 9, 10, 10a, 18, eingegangen am 25/10/2001 mit Schreiben vom 25/10/2001
19, 19a, 22, 25

Patentansprüche, Nr.:

10-19 ursprüngliche Fassung

1-9, 20-22 eingegangen am 25/10/2001 mit Schreiben vom 25/10/2001

Zeichnungen, Blätter:

1-8 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06313

Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	6,18-22
	Nein: Ansprüche	1-5,7-17,
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	6,18-22
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-22
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1.) Es wird auf folgende Dokumente Bezug genommen:

D1: EP-A-0 844 269 (KATAOKA KAZUNORI) 27. Mai 1998 (1998-05-27)

D2: WO 95 03356 A (GREF RUXANDRA ;DOMB ABRAHAM J (IL); PERACCHIA MARIA TERESA (IT); M) 2. Februar 1995 (1995-02-02)

2.) D1(S.24,Z.19-37, Ansprüche und Beispiele) ist neuheitschädlich für vorliegende Anspr.1-5,7-13 und 16.

Das anmeldungsgemäße Blockcopolymer und seine Verwendung werden offenbart. In D1 werden Blockcopolymere mit hydrophobem, bioabbaubaren Polymerteil (siehe D1, Anspr. 6) und hydrophilem Polymerteil offenbart, welches eine reaktive Gruppe für die kovalente Anbindung einer oberflächenaktiven Substanz, z.B. für Arzneien, hat. Durch ein bifunktionelles Molekül (siehe D1 Reaktionsschema, S. 14 und Beispiel 6) mit einer freien funktionellen Gruppe (siehe Anspr. 5 in D1) wird die reaktive Gruppe ins Blockcopolymer am hydrophilen Teil eingebracht. Daher fehlt Anspr.1-5,7-13 und 16 die in Art. 33(2) PCT geforderte Neuheit. Die Präsenz von funktionellen Gruppen am hydrophoben Blockpolymerteil ist durch den Wortlaut von Anspr.1 der vorliegenden Anmeldung nicht ausgeschlossen.

D2 (Ansprüche 1-42, siehe insbesondere Anspr. 1-6,13,20-28,31) ist neuheitschädlich für Anspr. 1-3,5,8-17 der vorliegenden Anmeldung.

Das anmeldungsgemäße Blockcopolymer, seine Verwendung und das Verfahren zur Herstellung des anmeldungsgemäßen Blockcopolymers (siehe Anspr. 20-42) werden offenbart. Zur Erläuterung: der Ausdruck "bifunktionelles Molekül mit mindestens einer freien funktionellen Gruppe in Anspr. 1 der vorliegenden Anmeldung umfaßt alle üblichen bifunktionelle Monomere, welche die Endgruppe des hydrophilen Blockcopolymerenteils darstellen können, z.B. Glykol beim Polyethylenglykol. Daher kann diese Ausdrucksweise das beanspruchte Blockcopolymer gegenüber D2 nicht neu machen. Es sei an dieser Stelle auch auf S. 19, Z.9-12 der Anmeldung hingewiesen, wonach bevorzugte reaktive Gruppen u.a. Hydroxylgruppen sind.

3.) Anspr. 6 betrifft "reaktive Gruppen", die in D1 und D2 nicht explizit genannt werden. In Anspr. 18 und 19 werden Verfahrensmerkmale beansprucht, die in D1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

und D2 nicht genannt werden. Wenn sich der Fachmann ausgehend von D1 oder D2 die Aufgabe gestellt hat, weitere Blockcopolymere bereitzustellen, enthaltend a) ein hydrophiles Polymer mit einer funktionellen Gruppe zur Anbindung oberflächenmodifizierender Substanzen und b) ein hydrophobes Polymer, gab es im zitierten Stand der Technik keinen Hinweis darauf, die in Anspr.6 genannten Verbindungen oder die in Anspr. 18 und 19 genannten Verfahrensmerkmale, z.B. den Einsatz des Blockcopolymeren als poröses Formteil, auszuprobieren um die oben genannte technische Aufgabe zu lösen.

Daher sind Anspr.6,18 und 19 neu und erfinderisch.

- 4.) Das im Verfahren der Anspr. 20-22 genannte Substratmuster wird in den im Internationalen Recherchenbericht zitierten Literaturstellen nicht erwähnt.

Daher sind Anspr. 20-22 neu.

Wenn sich der Fachmann ausgehend von D1 oder D2 die Aufgabe gestellt hat, weitere Blockcopolymere bereitzustellen, enthaltend a) ein hydrophiles Polymer mit einer funktionellen Gruppe zur Anbindung oberflächenmodifizierender Substanzen und b) ein hydrophobes Polymer, gab es im zitierten Stand der Technik keinen Hinweis darauf, die reaktiven Gruppen und/ oder die oberflächenaktive Substanz unter Erzeugung eines Substratmusters an das Blockcopolymer zu binden. Daher erscheinen Anspr. 20-22 erfinderisch.

- 5.) Die Streichung der ursprünglich offenbarten Maßgabe in Anspr. 1: .."dass wenn das hydrophile Polymer Polyethylenglykol ist, die reaktive Gruppe nicht Hydroxyl ist"... ist nach Art. 34(2)b nicht zulässig, da ursprünglich nicht offenbart.

Die Änderung in Beispiel 1 ist nach Art. 34(2)b nicht zulässig, da ursprünglich nicht offenbart.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

überzogen, wobei das Verbindungsmolekül eine funktionelle Gruppe trägt, an die oberflächenmodifizierende Substanzen gebunden werden. Nachteil des Verfahrens besteht wiederum darin, dass die Adsorption von unerwünschten Substanzen durch diesen Aufbau nicht unterdrückt wird.

5

US-Patent 5,320,840 beschreibt ein Polymer, welches wasserlöslich ist und damit nicht den Anforderungen an eine feste wasserunlösliche bioabbaubare Matrix genügt. Viele Verfahren, wie zum Beispiel das in US-Patent 5,240,747 beschriebene, erfordern zur Modifizierung von Polymeroberflächen drastische Bedingungen, wie zum Beispiel die Bestrahlung mit UV Licht oder die Präsenz funktioneller Gruppen in Form von Aminogruppen oder Polyaminen (US-Patent 5,399,665 und US-Patent 5,049,403).

15 In EP 0 844 269 ist ein Blockpolymer mit funktionellen Gruppen an beiden Enden beschrieben, wobei das Blockpolymer aus hydrophoben und hydrophilen Blöcken aufgebaut ist.

Die hydrophilen Blöcke tragen hierbei als funktionelle Gruppen Amino-, Carboxyl- oder Mercaptogruppen, die für eine kovalente Ankopplung von interessierenden oberflächenmodifizierenden Molekülen, die im allgemeinen als funktionelle Gruppen Amino-, Mercapto-, Hydroxylgruppen oder Doppelbindungen aufweisen, zunächst aktiviert werden müssen.

25 In WO 95/03356 werden nicht lineare Blockcopolymere beschrieben, die aufgebaut sind aus einem multifunktionellen Polymer, an das hydrophile und hydrophobe Polymere angebunden sind. Auch hier erfolgt eine mögliche kovalente Anbindung von modifizierenden Substanzen über eine terminale Hydroxylgruppe des hydrophilen Blocks, z.B. von Polyalkylenglycol, die eine vorhergehende Aktivierung erfordert.

30 Die oben dargelegten Beispiele zeigen den Bedarf an bioabbaubaren Polymeren, die folgende Eigenschaften besitzen:

1. Ausreichende Maskierung der Polymeroberfläche zur Unterdrückung unspezifischer Adsorption von Substanzen,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Göpfelch
9147 PCT / Ah-mes
25.10.2001

Ersatzseite

8a

2. Unterdrückung der unspezifischen Adhäsion von lebenden Zellen,
3. Vollständige Bioabbaubarekeit und Bioverträglichkeit der Abbauprodukte,
4. Einstellbarkeit der Dichte funktioneller Gruppen auf der Polymeroberfläche, die für die chemische Reaktion mit einer Vielzahl
- 5 oberflächenmodifizierender Substanzen geeignet sind,
5. Bereitstellung der Möglichkeit, die Polymeroberfläche mit mehreren verschiedenen Substanzen zu belegen,
6. vor oder nach der Verarbeitung zu Formkörpern (zum Beispiel Filme, poröse Schwämme, Mikropartikel, Nanopartikel, Mizellen etc.) eine
- 10 Bindung der oberflächenmodifizierenden Substanzen zu erlauben, und
7. Bildung von Mustern durch Bindung oberflächenmodifizierender Substanzen auf der Polymeroberfläche.

Um an Polymeroberflächen oberflächenmodifizierende Substanzen dauerhaft zu

15 verankern, sind zwei Voraussetzungen zu erfüllen:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. Die Polymere müssen an ihrer Oberfläche funktionelle Gruppen tragen, an denen sich die Substanzen chemisch binden lassen.
2. Die funktionellen Gruppen müssen für diese chemischen Reaktionen gut zugänglich sein.

5

Bekannte bioabbaubare Polymere, wie Poly(α -hydroxy ester) [zum Beispiel Poly(laktid), Poly(laktid-co-glykolid)], Polyanhydride oder Poly(β -hydroxy ester), besitzen zwar geeignete funktionelle Gruppen an beiden Moleküleenden, allerdings sind diese Gruppen an der Oberfläche nur schwer zugänglich.

- 10 Poly(laktid) hat beispielsweise eine Alkohol- und eine Carbonsäurefunktion als Endgruppe, die allerdings aus oben genannten Gründen eine Anbindung an die Polymeroberfläche nicht erlauben.

- 15 Zur Lösung der vorstehend genannten Aufgaben wird erfindungsgemäß ein Blockcopolymer bereitgestellt enthaltend ein hydrophobes bioabbaubares Polymer a), ein hydrophiles biokompatibles Polymer b), mindestens eine reaktive Gruppe c) für die kovalente Anbindung von einer oberflächenmodifizierenden Substanz d) an das hydrophile Polymer b),
20 wobei die mindestens eine reaktive Gruppe c) ein mindestens bifunktionelles Molekül mit mindestens einer freien funktionellen Gruppe ist.

- Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein oberflächenmodifiziertes Blockcopolymer, das als zusätzliche Komponente eine
25 oberflächenmodifizierende Substanz d) über die reaktive Gruppe c) als Bindeglied gebunden aufweist und Verfahren zu deren Herstellung.
In einer bevorzugten Ausgestaltung liegen die Blockcopolymere als Formkörper vor.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Weiter betrifft die Erfindung die Anwendung der Blockcopolymere, insbesondere im Bereich des drug delivery, drug targeting und vorzugsweise für das tissue engineering.

5

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Blockcopolymers, wobei die Anbindung der mindestens einen Substanz d) an die Oberfläche des Blockcopolymers unter Erzeugung eines Substratmusters erfolgt, und die reaktive Gruppe c) ausgewählt wird unter 1) einem mindesten bifunktionellen Molekül mit mindestens einer freien funktionellen Gruppe und/oder 2) einer funktionellen Gruppe, und damit erhältliche Blockcopolymere..

Aufgrund ihres Aufbaus aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Anteil besitzen die erfindungsgemäßen Blockcopolymere einen tensidartigen Charakter. Dieser bewirkt, dass das Polymer zum Beispiel bei Kontakt mit einem wässrigen Medium eine Orientierung erfährt, wobei die hydrophile Komponente b) auf der Polymeroberfläche angereichert vorliegt und dadurch die freie Zugänglichkeit oberflächenmodifizierender Substanzen d) an die reaktive Gruppe c) für die Anbindung ermöglicht.

Gegenstand der Erfindung sind somit Polymere, bei denen ein Teil der Kette, die hydrophile Komponente b) aus der Polymeroberfläche herausragt und für einen ausreichenden Abstand zwischen Polymeroberfläche und reaktiver Gruppe c) sorgt, wodurch die Bindung von oberflächenmodifizierenden Substanzen an die reaktive Gruppe c) erleichtert wird.

Dadurch lassen sich auf einfache Art und Weise spezielle Oberflächen konstruieren und bestmöglich für solche Anwendungen präparieren, bei denen die Oberfläche von Materialien dazu dient, eine bestimmte Funktionalität zu übernehmen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Grenzzeile

10a

Gleichzeitig sorgen die erfindungsgemäßen Blockcopolymere für eine Unterdrückung der unspezifischen Adsorption von Molekülen und Adhäsion von Zellen an ihrer Oberfläche.

- 5 Eine wichtige Eigenschaft der hier beschriebenen Blockcopolymere ist die vollständige Blockompatibilität der verwendeten Molekülteile, wobei mindestens die hydrophobe Komponente a) biologisch abbaubar ist.
- Hierin besteht auch ein Vorteil dieser Polymere im Vergleich zu bereits beschriebenen Systemen zur Modifizierung von Oberflächen, die zum Beispiel
- 10 auf Polystyrol, Glas oder Metalle zurückgreifen (Mikulec, L.J. and Puleo, D.A. J.Biomed.Mater.Res.32 (1996) 203-208; Puleo, D.A. J.Biomed.Mater.Res.29

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gopferich
9147 PCT / Ah-mss
25.10.2001

Ersatzseite

18

Das hydrophobe Polymer a) ist mindestens eines ausgewählt unter Polylactid, Polyglykolid und Poly(lactid-co-glykolid).

- 5 Insbesondere bevorzugt ist ein Polylactid, zum Beispiel ein Poly(D,L-Lactid), vorzugsweise mit einer Molmasse in einem Bereich von 1.000 bis 100.000, insbesondere bis 50.000 Da.

Das hydrophile Polymer b) ist ein Polyethylenglykol (PEG), wobei Polyethylenglykole mit einer Molmasse in einem Bereich von 200 bis 10.000 Da,

- 10 insbesondere 1.000 bis 10.000 Da, besonders bevorzugt sind.

Prinzipiell kann die reaktive Gruppe c) eine beliebige funktionelle Gruppe oder ein mindestens bifunktionelles Molekül sein, die mit der gewählten oberflächenmodifizierenden Substanz d) eine kovalente Bindung ausbilden
15 können, mit der Maßgabe, dass für ein Blockcopolymer nach einem der Ansprüche 1 bis 19 a) reaktive Gruppe c) ein mindestens bifunktionelles Molekül eingesetzt wird.

Die reaktive Gruppe c) kann bestehen aus

- 20 einer einzelnen funktionellen Gruppe (zum Beispiel Aminogruppe, Carboxylgruppe) und damit direkter Aktivierung des hydrophilen Polymers (zum Beispiel aktivierte Säurefunktion oder Epoxid);
physiologischen Dicarbonsäuren (Bernsteinsäure, Weinsäure und Abwandlungen davon wie sie in Anderson, G.W. et al.
25 J.Am.Chem.Soc.86 (1964) 1839-1842] beschrieben sind, die mit Abgangsgruppen (Succinimidylestern) versehen sind, um die Bildung einer bzw. zweier Säureamidgruppierungen zu erreichen;
Dialdehyden (z.B. Glutardialdehyd);
Speziellen "Molekülen" für selektive Bindung von Thiolen wie sie in
30 Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996) beschrieben sind, zum Beispiel N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) oder Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC);

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- Photoreaktiven Crosslinkern wie sie in Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996) beschrieben sind, zum Beispiel N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure (NHS-ASA), Sulfosuccinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat (SASD);
- 5 Spaltbaren Crosslinkern wie sie in Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996) beschrieben sind, zum Beispiel Verbindungen aus den oben genannten Gruppen, die sich durch spezielle Reagenzien spalten lassen zum Beispiel Disulfide durch Hydrogenolyse oder durch Disulfidaustausch, Glykolgruppen mit Periodat (zum Beispiel bei der
- 10 Weinsäure), Estergruppen mit Hydroxylamin; und Enzymatisch spaltbaren Molekülen wie entsprechende Peptide, zum Beispiel die Sequenz Leu-Gly-Pro-Ala, die von Kollagenase gespalten werden kann, oder Oligosaccharide.
- 15 Besonders bevorzugte Beispiele sind reaktive Gruppen c) ausgewählt unter mindestens einer Aminogruppe, Hydroxylgruppe, Thiol, Carbonsäure, Säurechlorid, Ketogruppe, - und insbesondere für den Gegenstand der Ansprüche 1 bis 19 - Dicarbonsäureamid, 3-Maleinimidopropionsäure-N-succinimidylester und Succinimidylester.
- 20 Die Synthese der erfindungsgemäßen Blockcopolymere läßt sich prinzipiell auf verschiedenen Wegen bewerkstelligen, wobei gängige Methoden der Polymerchemie verwendet werden.
- Zum einen können die Blöcke a) und b) separat synthetisiert und anschließend
- 25 kovalent gebunden werden. Alternativ dazu ist es möglich eine Polymerkette vorzulegen und die fehlende Kette durch Polymerisation an einem Polymerkettenende zu synthetisieren. So ist es zum Beispiel möglich, Blockcopolymere aus Poly(D,L-lactid) und Poly(ethylenglykol)-amin (PLA-PEG-NH₂) zu synthetisieren, indem man PEG-NH₂ vorlegt und die bioabbaubare PLA Kette
- 30 durch Ringöffnungspolymerisation aus Dilactid am Hydroxyende des PEG-NH₂ synthetisiert. Prinzipiell ist auch die umgekehrte Vorgehensweise möglich.

THIS PAGE BLANK

Ersatzseite

19a

- Die reaktive Gruppe c) kann hierbei wie im vorstehenden Beispiel im erhaltenen Polymer bereits vorhanden sein bzw. kann bei Bedarf eine in der hydrophilen Komponente b) vorhandene funktionelle Gruppe für die Anbindung der erwünschten oberflächenmodifizierenden Substanz d) zu einer geeigneten reaktiven Gruppe c) umgesetzt oder eingeführt werden.
- 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Göppelich
9147 PCT / Ah-mss
25.10.2001

Einsitzstelle

22

Nanopartikel, Polymerfilm oder Polymerschwamm in die Lösung der Substanz d) zu tauchen, um dann nach einer vorgegebenen Reaktionszeit das fertig modifizierte System zu erhalten (Instantreaktion).

- Alternativ zur beschriebenen Anbindung der Substanz d) an das Polymer mit reaktiver Gruppe c) ist aber auch der umgekehrte Weg möglich, nämlich zuerst die anzubindende Substanz d) mit der reaktiven Gruppe c) für eine Bindung zu aktivieren, und dann den Komplex aus Substanz d) und reaktiver Gruppe c) über die reaktive Gruppe c) an die Komponente b) des Blockcopolymers aus Komponente a) und b) unter Ausbildung des fertigen oberflächenmodifizierten erfindungsgemäßen Blockcopolymers zu binden.

- Hierbei ist jedoch von Nachteil, dass für eine Aktivierung der Substanz d) durch Anbindung der reaktiven Gruppe c) in aller Regel ein größerer Überschuß der reaktiven Gruppe c) hier zum Beispiel einer niedermolekularen Dicarbonsäure, erforderlich ist, um die Bildung von Dimeren zu verhindern. Dieser muß jedoch nach der Aktivierung wieder entfernt werden. Das hat zur Folge, dass sich, vor allem bei ebenfalls niedermolekularen Substanzen d), die Aufreinigung schwieriger gestaltet.

- Zusätzlich zur Herstellung von homogen belegten Oberflächen sind mit den erfindungsgemäßen Blockcopolymeren auch nicht homogen belegte Flächen einfach herzustellen. Das bedeutet, dass man beispielsweise Gradienten oder Muster (pattern) der oberflächenmodifizierenden Substanzen d) auf diesen Polymeren erzeugen kann. Das kann durch punktuell Aufbringen der Substanzen d) (zum Beispiel mit einem Tintenstrahlverfahren) oder aber durch punktuell Aktivierung der reaktiven Gruppen c) durch Bestrahlung (zum Beispiel mit UV-Licht), Beschuss mit Teilchen, Stempeln oder Soft Lithographie geschehen.

- So können strukturierte Oberflächen geschaffen werden, die es auch erlauben, beliebige Kombinationen von Substanzen d) zum Beispiel auf ihre Wirkung auf Zellen zu untersuchen bzw. um Kombinationen von Zellen in ganz spezieller räumlicher Orientierung zueinander zu züchten oder aber auch um mit Enzymen

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Göpferich
8147 PCT / Ah-mss
25.10.2001

Ergebnisse

25

1. Beispiel: Herstellung von aktivem SWS-NH-PEG-PLA

a) Synthese von NH_2 -PEG

Die Herstellung erfolgte nach Yokoyama, M. et al. Bioconj.Chem.3 (1992) 275-276.

- 5 Die gewünschte Menge Ethylenoxid wurde bei -79°C (Trockeneis + Methanolbad) in getrocknetes THF in einem Dreihalskolben eingeleitet und darin gelöst. Die Ethylenoxidflasche wurde nach dem Einleiten zurückgewogen und damit die vorgelegte Menge Ethylenoxid bestimmt. Entsprechend des gewünschten Molekulargewichts des Polymers wurde nun die berechnete
- 10 Menge 0,5M Lösung von Kalium-bis-(trimethylsilyl)-amid in Toluol aus einem Tropftrichter zugegeben.

- Das Reaktionsgemisch wurde dann bei 20°C in dem verschlossenen Dreihalskolben 36 Stunden gerührt. Die so erhaltene Polymerlösung wurde in
- 15 die 12fache Menge an Ether getropft und das gefällte Polymer daraus abfiltriert. Nach Auflösen des erhaltenen Polymers in THF wurde eine kleine Menge 0,1N Salzsäure zugegeben und damit das Silylamid gespalten. Die so erhaltene Lösung des fertigen Endprodukts wurde 5 Min bei Raumtemperatur gerührt und erneut in Ether gegeben, um das reine Polymer zu präzipitieren.

20

b) Synthese von NH_2 -PEG-PLA

Die Synthese erfolgte nach Kricheldorf, H.R. and Kreiser-Saunders, I. Macromol.Symp.103 (1996) 85-102; Loenslag, J.W. and Pennings, A.J. Makromol.Chem.188 (1987) 1809-1814.

- 25 Die Ausgangsprodukte der Synthese, das gemäß 1a) synthetisierte NH_2 -PEG und cyclisches DL-Dilactid (3,6-Dimethyl-1,4-dioxan-2,5-dion), wurden in den gewünschten Gewichtsverhältnissen in je einen Rundkolben gegeben und in Toluol p.A. aufgelöst. Dazu wurden beide Kolben am Wasserabscheider erhitzt, um das noch im Toluol vorhandene Wasser zu entfernen. Die so erhaltenen
- 30 Lösungen wurden dann im Dreihalskolben vereinigt und unter permanentem Stickstoffstrom erneut erhitzt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Göpfert
9147 PCT / Ali-miss
25.10.2001

Einheitsstelle

34

Ansprüche

1. Blockcopolymer enthaltend
ein hydrophobes bloabbaubares Polymer a),
ein hydrophilles Polymer b),
mindestens eine reaktive Gruppe c) für die kovalente Anbindung einer
oberflächenmodifizierenden Substanz d) an das hydrophile Polymer b),
wobei die mindestens eine reaktive Gruppe c) ein mindestens bifunktionelles
Molekül mit mindestens einer freien funktionellen Gruppe ist.
2. Blockcopolymer nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophobe Polymer a) und/oder hydrophile Polymer b) ausgewählt sind
unter einem linearen und/oder verzweigten Polymer.
3. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophobe Polymer a) mindestens ein Polymer ausgewählt unter
Polyester, Poly-ε-caprolacton, Poly-α-hydroxyester, Poly-β-hydroxyester, Polyamid,
Polyphosphazen, Polyanhydrid, Polydioxanon, Polyäpfelsäure, Polyweinsäure,
Polyorthoester, Polycarbonat, Peptid, Polysaccharid und Protein ist.
4. Blockcopolymer nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophobe Polymer a) mindestens ein Polymer ausgewählt unter
Polylactid, Polyglykollid, Poly(lactid-co-glykollid), Poly-β-hydroxybutyrat und Poly-β-
hydroxyvalerat ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophile Polymer b) mindestens ein Polymer ausgewählt unter Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polyethylenglykol/Polypropylenglykol-Copolymer, Polyethylenglykol/Polypropylenglykol/ Polyethylenglykol-Copolymer, Polybutylenglykol, Polyacrylamid, Polyvinylalkohol, Polysaccharid, Peptid und Protein ist.
6. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die reaktive Gruppe c) mindestens eine ausgewählt unter einem Dicarbonsäureamid, 3-Maleinimidopropionsäure-N-succinimidylester und Succinimidylester ist.
7. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophobe Polymer a) mindestens eines ausgewählt unter Polylactid, Polyglykolid und Poly(lactid-co-glykolid) ist.
8. Blockcopolymer nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophile Polymer b) Polyethylenglykol ist.
9. Blockcopolymer nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Polyethylenglykol eine Molmasse in einem Bereich von 200 bis 10.000 Da aufweist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Göppelich
9147 PCT / Alt-mss
25.10.2001

Frankfurt

38

20. Verfahren zur Herstellung eines Blockcopolymers nach einem der Ansprüche 12, 13 oder 17 bis 19,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Anbindung der mindestens einen Substanz d) an die Oberfläche des Blockcopolymers unter Erzeugung eines Substratmusters erfolgt, und die reaktive Gruppe c) ausgewählt wird unter 1) einem mindestens bifunktionellen Molekül mit mindestens einer freien funktionellen Gruppe und/oder 2) einer funktionellen Gruppe.

21. Verfahren nach Anspruch 20,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Substanz d) mit örtlich konstanter oder variabler Dichte über die reaktive Gruppe c) auf der Oberfläche eines Blockcopolymers enthaltend eine hydrophobe Komponente a) und hydrophile Komponente b) aufgebracht wird.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21,

dadurch gekennzeichnet,

dass für die Aufbringung der reaktiven Gruppe c) und/oder der Substanz d) in einem Substratmuster die Oberfläche des Blockcopolymers durch einen Plotter, einen Tintenstrahldrucker, Bestrahlung mit Licht, Beschuss mit Teilchen, Stempeln oder Soft Lithographie strukturiert wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

8

Applicant's or agent's file reference 9147 PCT / Me	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/06313	International filing date (day/month/year) 05 July 2000 (05.07.00)	Priority date (day/month/year) 05 July 1999 (05.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08G 63/664		
Applicant GÖPFERICH, Achim		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>13</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 02 February 2001 (02.02.01)	Date of completion of this report 20 November 2001 (20.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/06313

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1-7,11-17,20,21,23,24,26-33 , as originally filed,
 pages _____ , filed with the demand,
 pages 8.8a,9,10,10a,18,19,19a,22,25 , filed with the letter of 25 October 2001 (25.10.2001) ,
 pages _____ , filed with the letter of _____ .
- ☒ the claims. Nos. 10-19 , as originally filed,
 Nos. _____ , as amended under Article 19,
 Nos. _____ , filed with the demand,
 Nos. 1-9,20-22 , filed with the letter of 25 October 2001 (25.10.2001) ,
 Nos. _____ , filed with the letter of _____ .
- ☒ the drawings. sheets/fig 1-8 , as originally filed,
 sheets/fig _____ , filed with the demand,
 sheets/fig _____ , filed with the letter of _____ ,
 sheets/fig _____ , filed with the letter of _____ .

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPIC)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	6, 18 - 22	YES
	Claims	1 - 5, 7 - 17	NO
Inventive step (IS)	Claims	6, 18 - 22	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 22	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

D1: EP-A-0 844 269 (KATAOKA KAZUNORI) 27 May 1998
(1998-05-27)

D2: WO-A-95/03356 (GREF RUXANDRA; DOMB ABRAHAM J
(IL); PERACCHIA MARIA TERESA (IT); M) 2 February
1995 (1995-02-02)

2. D1 (page 24, lines 19-37, claims and examples) is prejudicial to the novelty of the current Claims 1-5, 7-13 and 16.

The claimed block copolymer and its use are disclosed. D1 discloses block copolymers with a hydrophobic, biodegradable polymer part (D1, Claim 6) and a hydrophilic polymer part which has a reactive group for the covalent binding of a surface-active substance, e.g. drugs. The reactive group is introduced into the block copolymer at the hydrophilic part by a bifunctional molecule (D1, reaction diagram, page 14, and Example 6) with a free functional group (D1, Claim 5). Therefore Claims 1-5, 7-13 and 16 lack the requisite novelty under PCT Article 33(2). The presence of functional

THIS PAGE BLANK (USPTO)

groups on the hydrophobic block polymer part is not excluded by the wording of Claim 1 of the present application.

D2 (Claims 1-42, see in particular Claims 1-6, 13, 20-28, 31) is prejudicial to the novelty of Claims 1-3, 5 and 8-17 of the present application. The claimed block copolymer, its use and the method of producing the claimed block copolymer (Claims 20-42) are disclosed. Note: the expression "bifunctional molecule having at least one free functional group" in Claim 1 of the present application includes all the conventional bifunctional monomers which can form the end group of the hydrophilic block copolymer part, e.g. glycol in the case of polyethylene glycol. Therefore this mode of expression cannot make the claimed block copolymer novel with respect to D2. Reference is also made at this point to page 19, lines 9-12, of the application, according to which preferred reactive groups are hydroxyl groups, *inter alia*.

3. Claim 6 concerns "reactive groups" which are not explicitly mentioned in D1 and D2. Claims 18 and 19 claim method features which are not mentioned in D1 and D2. If a person skilled in the art, proceeding from D1 or D2, is faced with the task of preparing further block copolymers containing a) a hydrophilic polymer with a functional group for binding surface-modifying substances and b) a hydrophobic polymer, the cited prior art does not suggest trying the compounds mentioned in Claim 6 or the method features mentioned in Claims 18 and 19, for example the use of the block copolymer as a porous moulded part, in order to solve the above-mentioned

THIS PAGE BLANK (USPTO)

technical problem.

Therefore Claims 6, 18 and 19 are novel and inventive.

4. The substrate pattern according to the method of Claims 20-22 is not mentioned in the passages from the literature cited in the international search report.

Therefore Claims 20-22 are novel.

If a person skilled in the art, proceeding from D1 or D2, is faced with the task of preparing further block copolymers containing a) a hydrophilic polymer with a functional group for binding surface-modifying substances and b) a hydrophobic polymer, the cited prior art does not suggest binding to the block copolymer the reactive groups and/or the surface-active substance, producing a substrate pattern. Therefore Claims 20-22 appear inventive.

5. The deletion of the originally disclosed feature from Claim 1: "that, when the hydrophilic polymer is polyethylene glycol, the reactive group is not hydroxyl", is not acceptable under PCT Article 34(2)(b), since it was not originally disclosed.

The amendment in Example 1 is unacceptable under PCT Article 34(2)(b) since it was not originally disclosed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Januar 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/02460 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C08G 63/664,
81/00, A61L 27/18, A61K 47/48

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06313

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Juli 2000 (05.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 30 729.6 5. Juli 1999 (05.07.1999) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: GÖPPERICH, Achim [DE/DE]; Enzianstrasse
5 a, D-93161 Sinzing (DE).

(72) Erfinder: und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TESSMAR, Jörg

[DE/DE]; Konrad-Adenauer-Allee 38, D-93051 Re-
gensburg (DE). SCHULZ, Michaela [DE/DE];
Thomas-Dehler-Weg 7, D-93051 Regensburg (DE).
BLUNK, Torsten [DE/DE]; Dorfstrasse 13 c, D-93080
Pentling (DE). MIKOS, Antonios [GR/US]; 4100 Green-
briar Drive # 345, Houston, TX 77098 (US).

(74) Anwalt: AHRENS, Gabriele; Jasperallee 1 a, 38102
Braunschweig (DE).

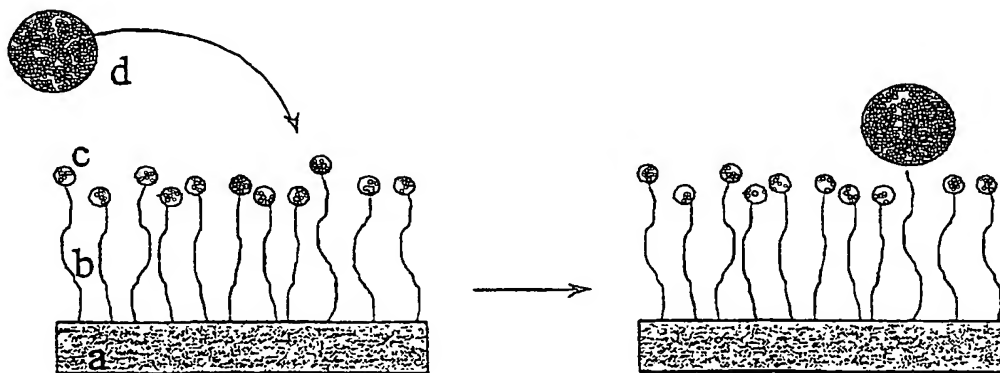
(81) Bestimmungsstaaten (national): AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: BIODEGRADABLE BLOCK COPOLYMERS WITH MODIFIABLE SURFACE

(54) Bezeichnung: BIOABBAUBARE BLOCKCOPOLYMERE MIT MODIFIZIERBARER OBERFLÄCHE



(57) Abstract: The invention relates to a block copolymer containing: a) a hydrophobic biodegradable polymer; b) a hydrophilic polymer and c) at least one reactive group for covalent binding of a surface-modified substance d) to the hydrophilic polymer b). The invention relates to shaped bodies consisting of said block copolymer and to their utilization, particularly as carriers for tissue culture and active substances and for controlled release and targeted administration of active substances.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Blockcopolymer enthaltend a) ein hydrophobes bioabbaubares Polymer, b) ein hydrophiles Polymer und c) mindestens eine reaktive Gruppe für die kovalente Anbindung einer oberflächenmodifizierenden Substanz d) an das hydrophile Polymer b), Formkörper aus diesem Blockcopolymer sowie dessen Anwendung, insbesondere als Träger für die Gewebezüchtung, als Träger für Wirkstoffe und zur kontrollierten Freigabe und gezielten Verabreichung von Wirkstoffen.



FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

Veröffentlicht:

- *Mit internationalem Recherchenbericht.*
- *Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.*

Bioabbaubare Blockcopolymere mit modifizierbarer Oberfläche

Gegenstand der Erfindung sind Blockcopolymere mit einem hydrophoben bioabbaubaren Anteil und einem hydrophilen biokompatiblen Anteil, die die selektive Anbindung von oberflächenmodifizierenden Substanzen erlauben und zugleich die unselektive Adhäsion unerwünschter Substanzen unterdrücken können, und daraus hergestellte Formkörper.

Derartige Blockcopolymere eignen sich insbesondere als Träger für Zellen für die Gewebezüchtung, als Träger für Wirkstoffe wie Medikamente, insbesondere zur kontrollierten Freigabe (drug delivery system) und zur gezielten Verabreichung von Wirkstoffen (drug targeting).

Biomaterialien, zu denen die erfindungsgemäßen Blockcopolymere gehören, spielen bei einer Reihe medizinischer Applikationen eine herausragende Rolle. Unter Biomaterialien versteht man Substanzen, die im menschlichen oder tierischen Körper als Ersatzstoffe für körpereigene Materialien eine bestimmte Funktion übernehmen. Beispiele hierfür sind Metalle oder Polymere, wie man sie zum Beispiel bei Totalendoprothesen im Bereich des Hüftgelenks verwendet. Ein Nachteil vieler Biomaterialien, die nur vorübergehend im Körper eingesetzt werden, wie zum Beispiel Nägel oder Platten im Bereich der Chirurgie besteht darin, dass sie nach der Applikation entfernt werden müssen. Aus diesem Grunde setzte zu Beginn der 70er Jahre die intensive Suche nach bioabbaubaren Materialien ein, die sich während der Applikation in körperverträgliche Bruchstücke abbauen.

Unter 'bioabbaubar' versteht man, dass das biologische System, in welches man ein Material bringt, zu dessen Abbau beiträgt [Vert, M. et al. „Degradable Polymers and Plastics“ Redwood Press Ltd. (1992) 73-92]. Besonders hervorzuheben sind bioabbaubare Polymermaterialien, die in Oligomere oder Monomere zerfallen. Als Beispiele für deren Anwendung seien chirurgisches Nahtmaterial oder abbaubare Arzneistoffträger genannt.

Die erfolgreiche Anwendung bioabbaubarer Polymere hat zu einer intensiven Suche nach neuen synthetischen Materialien geführt, aus der eine Vielzahl verschiedener Polymerklassen resultierte, wie zum Beispiel Poly(α -hydroxyester), Poly(β -hydroxyester), Polyanhydride, Polycyanoacrylate und viele
5 andere [Göpferich, A. (1997) 451-472; Göpferich, A. Biomaterials 17 (1996a) 103-114; Göpferich, A. Eur.J.Pharm.Biopharm. 42 (1996b) 1-11].

Besonderes Kennzeichen dieser Polymere ist ihre geringe Löslichkeit in wässrigen Medien, die sich erst durch den Polymerkettenabbau, d.h. die
10 Hydrolyse zu niedermolekularen Oligomeren oder Monomeren, verbessert und damit zur Erosion dieser Materialien führt.

Neben der Entwicklung von synthetischen bioabbaubaren Polymeren setzte gleichzeitig eine intensive Suche nach natürlichen Polymeren ein, die ähnliche
15 Eigenschaften besitzen. Beispiele hierfür sind Kollagen, Hyaluronsäure, Alginat und Zellulosederivate [Park, K. et al. Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery (1993)]. Bei diesen Substanzen wird zum Teil in Kauf genommen, dass sie eine erhöhte Wasserlöslichkeit besitzen. Um die Wasserlöslichkeit herabzusetzen, werden natürliche Polymere oft chemisch modifiziert, zum Beispiel durch
20 Veretherungen und Veresterungen funktioneller Gruppen in der Polymerkette oder durch Quervernetzungen einzelner Stränge. Als Beispiel sei hier die Quervernetzung von Kollagen, Gelatine oder Alginat genannt.

Verschiedene bioabbaubare Polymere unterscheiden sich vor allem durch die
25 Geschwindigkeit von Polymerkettenabbau und Erosion. Dies ist für viele Anwendungen von Bedeutung, bei denen sich der Polymerkettenabbau über einen definierten Zeitraum erstrecken muss, wie zum Beispiel bei der Freigabe von Arzneistoffen.

30 Wesentlich für die medizinische Anwendung synthetischer, partialsynthetischer und natürlicher bioabbaubarer Polymere ist deren Verträglichkeit mit dem biologischen System, in welches sie eingebracht werden. Für Anwendungen im menschlichen oder tierischen Organismus dürfen einzelne Bauteile, wie zum

Beispiel Oligomere oder Monomere nicht toxisch sein und die Polymere dürfen höchstens eine moderate Entzündungsreaktion im Gewebe auslösen.

Die oben genannten bioabbaubaren Polymere finden derzeit Verwendung zur kontrollierten Freigabe von Arzneistoffen (drug delivery) [Göpferich, A. Eur.J.Pharm.Biopharm.42 (1996b) 1-11] und als Träger für Zellen (tissue engineering) [Langer, R. and Vacanti, J.P. Science260 (1993) 920-926].

Im Rahmen des drug delivery geben bioabbaubare Polymere Arzneistoffe durch Diffusion, Erosion, Quellung oder osmotische Effekte kontrolliert frei.

Im Bereich des tissue engineering setzt man bioabbaubare Polymere zum Beispiel als poröse "Schwämme" ein, auf denen Zellen adhärieren, proliferieren und differenziert werden können. Während sich die Zellen zu einem Gewebeverband entwickeln, baut sich der Polymerträger ab und es resultiert ein Gewebe, welches sich in den menschlichen oder tierischen Körper transplantieren lässt.

Beispiele für Gewebe die derzeit auf diese Weise hergestellt werden, sind u.a. Knorpel, Knochen, Fettgewebe und Gefäße.

Die Anwendung bioabbaubarer Polymere im Bereich des tissue engineering und des drug delivery stellen besondere Anforderungen an diese Materialien.

Neben der bereits erwähnten Biokompatibilität der Polymere und ihrer Abbauprodukten stellen diese Anwendungen besondere Anforderungen an die Oberflächeneigenschaften der Polymere.

Zunächst seien einige Beispiele aus dem Bereich des drug delivery genannt :

1. Man beobachtet häufig eine Adsorption von Molekülen (zum Beispiel Arzneistoffe, Proteine und Peptide) an die Polymeroberflächen. Dies kann dazu führen, dass der bioabbaubare Arzneistoffträger seine Dosis nicht im gewünschten Umfang und nicht mit der gewünschten Kinetik freisetzt. Im Extremfall kann dies auch die Inaktivierung des Wirkstoffes zur Folge haben. Die Adsorption von Wirkstoffen ist daher in vielen Fällen unerwünscht und muss unterdrückt werden.

2. Die Verträglichkeit eines bioabbaubaren Polymers hängt in hohem Maße von dessen Oberflächeneigenschaften ab. So werden diese Polymere in Form von Teilchen im Mikrometer- und Nanometerbereich von Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel Makrophagen nach Absorption körpereigener Proteine erkannt und anschließend phagozytiert.

Die Kontrolle der Oberflächeneigenschaften kleiner Teilchen als parenterale Arzneiformen ist daher für deren erfolgreichen Einsatz erforderlich.

10

3. Man versucht seit langem, bioabbaubare Nanopartikel für die gezielte Verabreichung von Substanzen an spezifische Gewebe (zum Beispiel Tumore oder zentrales Nervensystem) einzusetzen (drug targeting). Dabei stellte sich heraus, dass körpereigenen Proteine, die auf den Partikeloberflächen adsorbiert werden, dafür verantwortlich sind, wohin diese Partikel transportiert werden [Juliano, R.L. Adv.Drug Delivery Rev.2 (1988) 31-54]. Bisher ist man nur bedingt in der Lage, eine gezielte Adsorption dieser Proteine an die Partikel zu erreichen. Polymere, welche auf einfache Art und Weise die gezielte Modifikation ihrer Oberflächen erlauben, sind daher vorteilhaft.

20

Auch im Bereich des tissue engineering spielen die Oberflächeneigenschaften bioabbaubarer Polymere eine bedeutende Rolle :

1. Die Wechselwirkungen zwischen Zellen und Polymer entscheiden über Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Verantwortlich für die Anheftung der Zellen an die Polymeroberflächen sind natürliche Verankerungsmechanismen der Zellen. Proteine, wie zum Beispiel Integrine, erlauben es, dass sich Zellen an spezifische Aminosäuresequenzen anheften. Die Anheftung an bioabbaubare Polymere kommt dadurch zustande, dass Proteine aus Körperflüssigkeiten oder Zellkulturmedien unspezifisch an die Polymeroberflächen adsorbieren und sich die Zellen ihrerseits wiederum an die entsprechenden

30

Aminosäuresequenzen der Proteine anheften. Diese unspezifische Adsorption von Proteinen bewirkt, dass sich eine Vielzahl verschiedener Zellen an die Oberfläche anheftet. Dies ist vor allem dann von Nachteil, wenn auf dem bioabbaubaren Polymer eine bestimmte Zellsorte adhärert werden soll. Die Kontrolle über die Adsorption von Proteinen und Peptiden ist daher erwünscht.

2. Die Aminosäuresequenzen, an die Zellen anbinden, sind oft für einen Zelltypus spezifisch, d.h. belegt man die Oberfläche eines Polymers mit einer zellspezifischen Sequenz, dann adhärert bevorzugt dieser Zelltyp

3. Die Membran einer Zelle trägt eine Reihe von Rezeptoren, wobei über diese Rezeptoren Einfluss auf das Verhalten der Zelle genommen werden kann. Befinden sich daher entsprechende "Signalstoffe", wie zum Beispiel Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine auf der Oberfläche von Polymeren, an die die Rezeptoren binden können, lässt sich über diese entsprechend belegten Polymeroberflächen das Verhalten der daran über die Rezeptoren haftenden Zellen beeinflussen.

Die oben genannten Beispiele zeigen die Bedeutung der Oberflächeneigenschaften eines bioabbaubaren Polymers bzw. die Bedeutung der Möglichkeit zur selektiven Modifizierung dieser Oberfläche für die erfolgreiche Applikation des Polymers.

Die Modifizierung der Oberflächeneigenschaften bioabbaubarer Polymere ist seit einigen Jahren Ziel intensiver Forschung.

Die ersten Ansätze zur Herstellung bioabbaubarer Polymere mit modifizierbaren Oberflächen gingen davon aus, in die Polymerkette von Poly(α -hydroxyestern), wie zum Beispiel Polylactid, Monomere einzubauen, wie zum Beispiel Lysin, die eine funktionelle Gruppe enthalten, an die sich Moleküle anheften lassen [Barrera, D.A. "Synthesis and Characterization of a novel Biodegradable Polymer - Poly(lactic acid-co-lysine)" 1993, Massachusetts Institute of Technology, PHD Thesis].

Ein Nachteil dieser Polymere besteht darin, dass die funktionellen Gruppen, hier Aminogruppen, in der Oberfläche nur schwer zugänglich sind. Um dies zu verbessern, wurden an diese funktionellen Gruppen Oligopeptide angeheftet, damit das Knüpfen neuer chemischer Bindungen erleichtert wird.

- 5 Von Nachteil ist, dass bei dem erhaltenen Polymer die unspezifische Adsorption von unerwünschten Proteinen und Peptiden erfolgt.

Dies führte zu neuen Entwicklungen, um ein breiter anwendbares System zu erhalten [Patel, N., Padera, R., Sanders, G. H., Cannizzaro, S. M., Davies, M. C.,
10 Langer, R., Roberts, C. J., Tendler, S. J., Williams, P. M., and Shakesheff, K. M. "Spatially controlled Tissue Engineering on Biodegradable Polymer Surfaces". 25(1), 109-110. 1998. Controlled Release Society, Inc. Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 1998]. Dabei macht man sich die Bindung von Biotin an das Protein Avidin zunutze, die sehr spezifisch ist. Man verankert Biotin auf
15 einer Polymeroberfläche und bindet an die Substanz, mit der man die Oberfläche belegen will ebenfalls Biotin. In Gegenwart von Avidin, welches mehrere Bindungsstellen für Biotin besitzt, kommt es dann zur gezielten Anheftung der biotinylierten Verbindung an die Oberfläche.

Ein Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass sich auf einer Polymeroberfläche
20 Muster erzeugen lassen. Dies hat Bedeutung für Gewebe, bei denen eine strukturierte Anordnung von Zellen erforderlich ist.

Von Nachteil ist jedoch, dass man über die Verankerung von Avidin ein Protein verwendet, welches körperfremd ist und somit zu unerwünschten Reaktionen führen kann. Zusätzlich muss die zu verankernde Substanz erst biotinyliert
25 werden, was das Verfahren kompliziert und damit die Anwendbarkeit einschränkt. Gleichzeitig ist die Oberfläche mit Avidin belegt, was für viele Anwendungen unerwünscht ist.

Andere Methoden verwenden zur Anheftung oberflächenmodifizierender
30 Substanzen an die Oberfläche des bioabbaubaren Polymers ein weiteres Polymer.

So wird zum Beispiel Polyethylenglykol an die zu modifizierende Oberfläche angeheftet, was die entsprechende Existenz funktioneller Gruppen auf den

Oberflächen voraussetzt [US-Patent 5,906,828]. Diese funktionellen Gruppen müssen bei diesen Entwicklungen zum Teil durch chemische Reaktionen erst erzeugt werden. Dies ist ein zusätzlicher Verfahrensschritt und erhöht den Aufwand für die Anwendung dieses Verfahrens in unerwünschter Weise.

5

In dem US-Patent 5,330,911 ist die Verankerung von speziellen Peptidsequenzen auf Keramiken, Polyhydroxyethylmethacrylat und Polyethylenterephthalat beschrieben. Das Verfahren setzt die Existenz funktioneller Gruppen voraus und ist nicht dazu geeignet, unspezifische Adsorption zu unterdrücken.

10

Ein weiteres Verfahren stützt sich auf Polyalkylimin als Abstandshalter („Spacer“) zwischen der Polymeroberfläche und anzuheftender Substanz [US-Patent 5,308,641]. Das Verfahren hat die gleichen Nachteile wie für US-Patent 5,330,911 beschrieben und setzt die Existenz entsprechender funktioneller Gruppen auf der Polymeroberfläche voraus.

15

In dem US-Patent 5897955 und der WO 97/46267 A1 wird ein Verfahren beschrieben, wobei die zu modifizierende Oberfläche des Polymers zunächst mit einem Tensid belegt wird, welches dann erst nach Quervernetzung die eigentliche Oberfläche bildet, an die Substanzen gebunden werden können. Auch hier ergibt sich der Nachteil, dass damit keine ausreichende Maskierung der Oberfläche erzielt wird und unspezifische Adsorption nicht unterdrückt werden kann.

20

25

Zur Erhöhung der Kompatibilität von Polymeroberflächen wurde vorgeschlagen, an diese Oberflächen asymmetrische Moleküle über radikalische Mechanismen anzubinden. Diese Vorgehensweise ist dadurch an spezifische Materialien gebunden, die zunächst an der Polymeroberfläche adsorbieren und sich anschließend quervernetzen lassen.

30

Gemäß dem US-Patent 5,263,992 wird die Oberfläche von Biomaterialien zunächst mit einem Verbindungsmolekül in einer radikalischen Reaktion

überzogen, wobei das Verbindungsmolekül eine funktionelle Gruppe trägt, an die oberflächenmodifizierende Substanzen gebunden werden. Nachteil des Verfahrens besteht wiederum darin, dass die Adsorption von unerwünschten Substanzen durch diesen Aufbau nicht unterdrückt wird.

5

US-Patent 5,320,840 beschreibt ein Polymer, welches wasserlöslich ist und damit nicht den Anforderungen an eine feste wasserunlösliche bioabbaubare Matrix genügt. Viele Verfahren, wie zum Beispiel das in US-Patent 5,240,747 beschriebene, erfordern zur Modifizierung von Polymeroberflächen drastische
10 Bedingungen, wie zum Beispiel die Bestrahlung mit UV Licht oder die Präsenz funktioneller Gruppen in Form von Aminogruppen oder Polyaminen (US-Patent 5,399,665 und US-Patent 5,049,403).

Die oben dargelegten Beispiele zeigen den Bedarf an bioabbaubaren Polymeren,
15 die folgende Eigenschaften besitzen:

1. Ausreichende Maskierung der Polymeroberfläche zur Unterdrückung unspezifischer Adsorption von Substanzen,
2. Unterdrückung der unspezifischen Adhäsion von lebenden Zellen,
3. Vollständige Bioabbaubarkeit und Bioverträglichkeit der Abbauprodukte,
- 20 4. Einstellbarkeit der Dichte funktioneller Gruppen auf der Polymeroberfläche, die für die chemische Reaktion mit einer Vielzahl oberflächenmodifizierender Substanzen geeignet sind,
5. Bereitstellung der Möglichkeit, die Polymeroberfläche mit mehreren verschiedenen Substanzen zu belegen,
- 25 6. vor oder nach der Verarbeitung zu Formkörpern (zum Beispiel Filme, poröse Schwämme, Mikropartikel, Nanopartikel, Mizellen etc.) eine Bindung der oberflächenmodifizierenden Substanzen zu erlauben, und
7. Bildung von Mustern durch Bindung oberflächenmodifizierender Substanzen auf der Polymeroberfläche.

30

Um an Polymeroberflächen oberflächenmodifizierende Substanzen dauerhaft zu verankern, sind zwei Voraussetzungen zu erfüllen:

1. Die Polymere müssen an ihrer Oberfläche funktionelle Gruppen tragen, an denen sich die Substanzen chemisch binden lassen.
2. Die funktionellen Gruppen müssen für diese chemischen Reaktionen gut zugänglich sein.

5

Bekannte bioabbaubare Polymere, wie Poly(α -hydroxy ester) [zum Beispiel Poly(laktid), Poly(laktid-co-glykolid)], Polyanhydride oder Poly(β -hydroxy ester), besitzen zwar geeignete funktionelle Gruppen an beiden Moleküleenden, allerdings sind diese Gruppen an der Oberfläche nur schwer zugänglich.

- 10 Poly(laktid) hat beispielsweise eine Alkohol- und eine Carbonsäurefunktion als Endgruppe, die allerdings aus oben genannten Gründen eine Anbindung an die Polymeroberfläche nicht erlauben.

- Zur Lösung der vorstehend genannten Aufgaben wird erfindungsgemäß ein
- 15 Blockcopolymer bereitgestellt enthaltend
ein hydrophobes bioabbaubares Polymer,
ein hydrophiles biokompatibles Polymer,
mindestens eine reaktive Gruppe für die kovalente Anbindung von einer
oberflächenmodifizierenden Substanz d) an das hydrophile Polymer b),
20 wobei die mindestens eine reaktive Gruppe c) ausgewählt ist unter 1) einer funktionellen Gruppe und/oder 2) einem mindestens bifunktionellen Molekül mit mindestens einer freien funktionellen Gruppe, mit der Maßgabe, dass wenn die hydrophile Komponente b) Polyethylenglykol ist, die reaktive Gruppe c) keine Hydroxylgruppe ist.

25

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein oberflächenmodifiziertes Blockcopolymer, das als zusätzliche Komponente eine oberflächenmodifizierende Substanz d) über die reaktive Gruppe c) als Bindeglied gebunden aufweist und Verfahren zu deren Herstellung.

- 30 In einer bevorzugten Ausgestaltung liegen die Blockcopolymere als Formkörper vor.

Weiter betrifft die Erfindung die Anwendung der Blockcopymere, insbesondere im Bereich des drug delivery, drug targeting und vorzugsweise für das tissue engineering.

- 5 Aufgrund ihres Aufbaus aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Anteil besitzen die erfindungsgemäßen Blockcopolymere einen tensidartigen Charakter. Dieser bewirkt, dass das Polymer zum Beispiel bei Kontakt mit einem wässrigen Medium eine Orientierung erfährt, wobei die hydrophile Komponente b) auf der Polymeroberfläche angereichert vorliegt und dadurch die freie
10 Zugänglichkeit oberflächenmodifizierender Substanzen d) an die reaktive Gruppe c) für die Anbindung ermöglicht.

- Gegenstand der Erfindung sind somit Polymere, bei denen ein Teil der Kette, die hydrophile Komponente b) aus der Polymeroberfläche herausragt und für einen
15 ausreichenden Abstand zwischen Polymeroberfläche und reaktiver Gruppe c) sorgt, wodurch die Bindung von oberflächenmodifizierenden Substanzen an die reaktive Gruppe c) erleichtert wird.

- Dadurch lassen sich auf einfache Art und Weise spezielle Oberflächen konstruieren und bestmöglich für solche Anwendungen präparieren, bei denen
20 die Oberfläche von Materialien dazu dient, eine bestimmte Funktionalität zu übernehmen.

- Gleichzeitig sorgen die erfindungsgemäßen Blockcopolymere für eine Unterdrückung der unspezifischen Adsorption von Molekülen und Adhäsion von
25 Zellen an ihrer Oberfläche.

- Eine wichtige Eigenschaft der hier beschriebenen Blockcopolymere ist die vollständige Biokompatibilität der verwendeten Molekülteile, wobei mindestens die hydrophobe Komponente a) biologisch abbaubar ist.
- 30 Hierin besteht auch ein Vorteil dieser Polymere im Vergleich zu bereits beschriebenen Systemen zur Modifizierung von Oberflächen, die zum Beispiel auf Polystyrol, Glas oder Metalle zurückgreifen [Mikulec, L.J. and Puleo, D.A. J.Biomed.Mater.Res.32 (1996) 203-208; Puleo, D.A. J.Biomed.Mater.Res.29

(1995) 951-957; Puleo, D.A. Biomaterials 17 (1996) 217-222; Puleo, D.A. J. Biomed. Mater. Res. 37 (1997) 222-228].

Im Gegensatz zu den genannten Materialien haben die erfindungsgemäßen Blockcopolymere das Potential sich nach Implantation in den menschlichen oder tierischen Körper je nach Bedarf in einer bestimmten Zeit zu zersetzen und den Körper zu verlassen.

Durch die Wahl der Komponenten a) und b) des Blockcopolymers, d.h. die Art und Länge der hydrophoben und der hydrophilen Polymerkette, lassen sich die Materialeigenschaften des Blockcopolymers festlegen. Beispielsweise kann man über die Länge bzw. Struktur der hydrophilen Komponente b) die Beweglichkeit der fixierten Substanz d) variieren. Über die Länge und Struktur der hydrophoben Komponente a) können die Abbaueigenschaften, die mechanische Festigkeit und die Löslichkeit zum Beispiel in Wasser oder einem organischen Lösungsmittel des Copolymers gesteuert werden.

So ist es möglich durch Veränderung der bioabbaubaren, lipophilen Kette der Komponente a) des Blockcopolymers die Abbauphase zu verlängern und die mechanische Festigkeit der Polymere zu erhöhen.

Die erfindungsgemäße Ausgestaltung als Blockcopolymer unterstützt die Orientierung, wobei die hydrophile Komponente überwiegend auf der Polymeroberfläche zu liegen kommt und fördert zum Beispiel die Ausbildung von Micellen im wässrigen Medium.

Es zeigen
Abbildung 1 die Anbindung einer oberflächenmodifizierenden Substanz d) an die Oberfläche eines erfindungsgemäßen Blockcopolymers über die reaktive Gruppe c);

Abbildung 2 den Aufbau eines erfindungsgemäßen Blockcopolymers;
Abbildung 3 eine mit unterschiedlichen Substanzen d) belegte Oberfläche eines erfindungsgemäßen Blockcopolymers;

Abbildung 4 Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von erfindungsgemäßen Blockcopolymeren mit unterschiedlichen Gehalt an Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von 5000 Da und einem Vergleichspolymer ohne PEG;

Abbildung 5 ESCA Spektren der Proteinadsorption auf unterschiedlichen Polymerfilmen;

Abbildung 6 ESCA Spektren der Peptidadsorption auf unterschiedlichen Polymerfilmen;

Abbildung 7 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Präadipozyten 3T3-L1 auf unterschiedlichen Polymerfilmen;

Abbildung 8 REM Aufnahmen von mesencymalen Stammzellen aus Ratten auf unterschiedlichen Polymeren;

Abbildung 9 Bestimmung der Aktivität eines erfindungsgemäßen Blockcopolymers über die Anbindung von EDANS und

Abbildung 10 die Anbindung von Trypsin an ein erfindungsgemäßes Polymer.

15

In den Abbildungen beziehen sich die verwendeten tiefgestellten Indices in den Polymerbezeichnungen auf das Molekulargewicht (Mn) ausgedrückt in kDa.

In Abbildung 2 ist ein erfindungsgemäßes oberflächenmodifiziertes Blockcopolymer mit seinen wesentlichen Bauteilen hydrophobe Komponente a), hydrophile Komponente b) und reaktive Gruppe c) sowie oberflächenmodifizierende Substanz d) dargestellt.

Hierbei dient die hydrophobe Komponente a) als Träger und zur Fixierung des gesamten Blockcopolymers, die hydrophile Komponente b) dazu, die reaktive Gruppe c) für die kovalente Anbindung einer oberflächenmodifizierenden Substanz d) verfügbar zu machen und zur Maskierung der Oberfläche und die reaktive Gruppe c) als Bindeglied zur dauerhaften Anbindung der oberflächenmodifizierenden Substanz d).

Das erfindungsgemäße Blockcopolymer kann für die jeweiligen Anwendungen in eine beliebige dafür geeignete Form gebracht werden, wobei die hierbei erhaltenen Formkörper ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind.

Das Blockcopolymer kann als zum Beispiel als Film, Partikel in der gewünschten Größe wie zum Beispiel Nano- oder Mikropartikel oder dreidimensionaler Formkörper wie zum Beispiel Monolith vorliegen. Die Formkörper können porös sein. Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung bildet das Blockcopolymer einen
5 porösen Formkörper zum Beispiel in Art eines Schwammes.

Erfindungsgemäß von Vorteil ist, dass das Blockcopolymer bzw. die daraus gebildeten Formkörper für „Instantreaktionen“ mit der Substanz d) geeignet sind, was bedeutet, dass sie auf Vorrat im voraus hergestellt und bis zur Anwendung
10 ohne weiteres gelagert werden können, ohne dass sie für die geplante Anwendung erst zeitaufwendig frisch zubereitet werden müssen

Das Blockcopolymer kann aus einem oder mehreren, auch verschiedenen Blöcken aus der hydrophoben a) und hydrophilen Komponente b) aufgebaut
15 sein, wobei die einzelnen Blöcke gleiche Monomere mit gegebenenfalls unterschiedlicher Kettenlänge oder verschiedene Monomere enthalten können.

Gemäß einer bevorzugten Ausgestaltung wird als Blockcopolymer ein Diblockcopolymer eingesetzt.
20

Die Komponenten a) und b) können gleichzeitig oder unabhängig voneinander linear oder verzweigt, kamm- oder sternförmig sein.

Komponente a) kann auch bei Bedarf eine quervernetzte Verbindung sein.

25 Die Oberfläche des Blockcopolymers kann mit einer einzigen oder mit verschiedenen Substanzen d) belegt sein, die mindestens eine Substanz d) kann auf der Oberfläche ein beliebiges Muster ausbilden, zum Beispiel kann die Dichte der mindestens einen Substanz d) örtlich konstant oder variabel sein, sie kann einen Gradienten ausbilden usw.

30 Die Art der Belegung der Oberfläche kann je nach Anwendungsfall gewählt werden. So hat sich gezeigt, dass eine graduelle Belegung mit Wachstumsfaktoren vorteilhaft sein kann.

Als bioabbaubare hydrophobe Komponente a) kann ein beliebiges, für die genannten Applikationen bekanntes bioabbaubares hydrophobes Polymer eingesetzt werden wie sie auch vorstehend bereits genannt worden sind. Weitere Polymere können der Literatur entnommen werden.

- 5 Das Polymer für die Komponente a) kann synthetisch, partialsynthetisch oder natürlichen Ursprungs sein.

- Sie kann ein Poly(α -hydroxyester (zum Beispiel Polymilchsäure, Polyglykolsäure und deren Copolymeren), Poly(ϵ -Caprolacton), Poly(β -hydroxyester (wie zum
- 10 Beispiel Poly(β -Hydroxybutyrat), Poly(β -Hydroxyvalerat)), Poly(dioxanon), Polyäpfelsäure, Polyweinsäure, Polyorthoester, Polycarbonat, Polyamid, Polyanhydrid, Polyphosphazen, Peptid, Polysaccharid, Protein u.a. Polymer sein wie sie in Göpferich A. "Mechanism of Polymer Degradation and Elimination" In: Domb A, Kost J Wiseman D, eds. Handbook of Biodegradable Polymers.
- 15 Harwood acad. publ. Inc., 1997: 451-472; Göpferich A : "Mechanisms of Polymer Degradation and Erosion" Biomaterials 17 1996a S.103-114 und Göpferich, A. Biomaterials 17 (1996a) 103-114; Göpferich, A. Eur.J.Pharm.Biopharm.42 (1996b) 1-11; Leenslag, J.W. et al. Biomaterials (1987) 311-314; Park, K. et al. Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery (1993); Suggs, L.J. and Mikos, A.G.
- 20 (1996) 615-624 beschrieben worden sind.

Weitere geeignete Verbindungen sind zum Beispiel im Handbook of biodegradable Polymers (1997) 451-472 beschrieben.

- Vorzugsweise ist das hydrophobe Polymer a) mindestens ein Polymer, das
- 25 ausgewählt ist unter einem Polyester, Poly- ϵ -caprolacton, Poly- α -hydroxyester, Poly- β -hydroxyester, Polyanhydrid, Polyamid, Polyphosphazen, Polydioxanon, Polyäpfelsäure, Polyweinsäure, Polyorthoester, Polycarbonat, Polysaccharid, Peptid und Protein.

- 30 Insbesondere ist die hydrophobe Komponente a) mindestens ein Polymer ausgewählt unter Polylactid, Polyglykolid, Poly(lactid-co-glykolid), Poly- β -hydroxybutyrat und Poly- β -hydroxyvalerat.

Vorzugsweise ist die hydrophobe Komponente a) wasserunlöslich.

Als bioabbaubare Komponente a) sind besonders Polymere geeignet, bei denen der Polymerkettenabbau durch Hydrolyse, enzymatische-, photolytische oder
5 andere Reaktionen herbeigeführt werden kann.

Die minimale Kettenlänge n , gemessen in Monomeren, beträgt $n=2$, die Obergrenze ergibt sich aus den für das jeweilige Monomer in der Polymerisationsreaktion maximal erreichbaren Molmassen bzw. aus den
10 erwünschten Eigenschaften für das Polymer, d.h. in Abhängigkeit von der beabsichtigten Anwendung.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung beziehen sich die Angaben über die Molmassen (Molekulargewicht), soweit nicht anders angeben, auf das
15 Zahlenmittel M_n .

So kann sich die Kettenlänge der Polymere für die Komponente a) von wenigen bis zu mehreren tausend Monomereinheiten bewegen und das Polymer ein Molekulargewicht von über 10 Millionen Dalton aufweisen kann.
20 Beispielsweise ist für Polylactid eine obere Grenze der Molmasse von bis zu 100.000 Da bevorzugt.

Wie bereits vorstehend erwähnt entscheidet die Länge der hydrophoben Komponente a) über die Eigenschaften des Blockcopolymers wie der
25 Abbaueigenschaften und der mechanischen Festigkeit.

Beispielsweise führt im Fall einer erfindungsgemäß bevorzugten Kombination von Poly(D,L-lactid) (PLA) als hydrophober Komponente a) und Poly(ethylenglykol) (PEG) für die hydrophile Komponente b) eine Kettenlänge
30 der hydrophoben Komponente a) von ca. $n < 20$ zu wasserlöslichen Produkten. Ist der PEG Gehalt größer als der PLA Gehalt, dann kann ebenfalls mit wasserlöslichen Produkten gerechnet werden.

Als hydrophile Komponente b) kann ein synthetisches, partialsynthetisches oder natürliches biokompatibles hydrophiles Polymer eingesetzt werden, die auch biologisch abbaubar sein kann.

5 Sie ist aufgebaut aus mindestens bifunktionalen und vorzugsweise wasserlöslichen Bausteinen.

Beispiele für geeignete Polymere sind Polyethylenglykole, Polyacrylamide, Polyvinylalkohol, Polysaccharide (zum Beispiel modifizierte Cellulosen und Stärken), Alginate, Peptide und Proteine.

10

Bevorzugte Beispiele für die hydrophile Komponente b) sind Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polyethylenglykol/Polypropylenglykol-Copolymer, Polyethylenglykol/Polypropylenglykol/Polyethylenglykol-Copolymer, Polybutylenglykol, Polyacrylamid, Polyvinylalkohol, Polysaccharid, Peptid und Protein.

15

Wird als hydrophile Komponente b) ein symmetrisches Molekül wie zum Beispiel PEG mit zwei gleichen funktionellen Endgruppen, hier Hydroxyl, eingesetzt, sollte bei der Verknüpfung mit der hydrophoben Komponente a) darauf geachtet werden, das die hydrophobe Komponente nicht gleichzeitig mit beiden funktionellen Endgruppen reagiert und damit keine der funktionellen Endgruppen als reaktive Gruppe c) zur kovalenten Anbindung von oberflächenmodifizierenden Substanzen mehr zur Verfügung steht.

20

Um dieses Problem zu umgehen wird für die Synthese eine hydrophile Komponente b) mit zwei unterschiedlichen funktionellen Endgruppen eingesetzt wie nachstehend am Beispiel des bevorzugt eingesetzten PEGs erläutert wird, wobei diese Ausführungen analog für andere symmetrische Moleküle gelten, die als hydrophile Komponente b) für das erfindungsgemäße Blockcopolymer einsetzbar sind.

25

So wird im Fall von PEG mit zwei Hydroxylgruppen als Endgruppen eine der Hydroxylgruppen durch eine andere funktionelle Gruppe ersetzt.

30

Beispielsweise kann Poly(ethylenglykol)-amin (PEG-NH₂) verwendet werden, bei dem eine endständige Hydroxylgruppe durch eine primäre Aminogruppe ersetzt wurde.

5 Dies gestattet es im Rahmen der Synthese die Anheftung der Monomere der hydrophoben Komponente a) so zu steuern, dass die chemische Reaktion nur an einem Molekülende abläuft.

Die Art der funktionellen Endgruppen ist dabei nicht auf Hydroxylgruppen und Aminogruppen beschränkt. Alternativ lassen sich Thiolgruppen, Doppelbindungen oder Carbonylfunktionen für die Synthese einsetzen. Weitere
10 funktionelle Gruppen sind an sich bekannt und können der Literatur entnommen werden.

Auch die Kettenlänge der hydrophilen Komponente bestimmt sich je nach Anwendung und Bedarf.

15 Beispielsweise liegt die minimale Kettenlänge für PEG bzw. eines asymmetrischen substituierten PEGs wie zum Beispiel PEG-NH₂ bei einer Ethyleneinheit (Ethanolamin).

Die obere Grenze kann für bestimmte Anwendungen in menschlichen und tierischen Körpern durch das Erfordernis gesetzt sein, dass die freigesetzten
20 Bruchstücke noch nierengängig sein sollten und ausgeschieden werden können.

Geeignete Molmassen insbesondere für die Anwendung im menschlichen oder tierischen Körper liegen vorzugsweise bei 200 bis 10.000 Da, besonders bevorzugt bei 1.000 bis 10.000 Da, wobei insbesondere für Anwendungen
25 außerhalb eines menschlichen oder tierischen Körpers auch Polymere mit höheren Molmassen bis zu mehreren Millionen Da einsetzbar sind.

Vor allem PEG hat sich als besonders geeignet erwiesen eine Polymeroberfläche gegen die Adsorption von Molekülen und die Adhäsion von Zellen zu maskieren.

30

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt sind Blockcopolymere, die aus folgenden Kombinationen zusammengesetzt sind.

Das hydrophobe Polymer a) ist mindestens eines ausgewählt unter Polylactid, Polyglykolid und Poly(lactid-co-glykolid).

Insbesondere bevorzugt ist ein Polylactid, zum Beispiel ein Poly(D,L-Lactid), vorzugsweise mit einer Molmasse in einem Bereich von 1.000 bis 100.000, insbesondere bis 50.000 Da.

Das hydrophile Polymer b) ist ein Polyethylenglykol (PEG), wobei Polyethylenglykole mit einer Molmasse in einem Bereich von 200 bis 10.000 Da, insbesondere 1.000 bis 10.000 Da, besonders bevorzugt sind.

10 Prinzipiell kann die reaktive Gruppe c) eine beliebige funktionelle Gruppe oder ein mindestens bifunktionelles Molekül sein, die mit der gewählten oberflächenmodifizierenden Substanz d) eine kovalente Bindung ausbilden können.

15 Die reaktive Gruppe c) kann bestehen aus

einer einzelnen funktionellen Gruppe (zum Beispiel Aminogruppe, Carboxylgruppe) und damit direkter Aktivierung des hydrophilen Polymers (zum Beispiel aktivierte Säurefunktion oder Epoxid);

20 physiologischen Dicarbonsäuren (Bernsteinsäure, Weinsäure und Abwandlungen davon wie sie in Anderson, G.W. et al. J.Am.Chem.Soc.86 (1964) 1839-1842] beschrieben sind, die mit Abgangsgruppen (Succinimidylestern) versehen sind, um die Bildung einer bzw. zweier Säureamidgruppierungen zu erreichen;

Dialdehyden (z.B. Glutardialdehyd);

25 Speziellen "Molekülen" für selektive Bindung von Thiolen wie sie in Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996) beschrieben sind, zum Beispiel N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) oder Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC);

30 Photoreaktiven Crosslinkern wie sie in Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996) beschrieben sind, zum Beispiel N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure (NHS-ASA), Sulfosuccinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat (SASD);

Spaltbaren Crosslinkern wie sie in Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996) beschrieben sind, zum Beispiel Verbindungen aus den

oben genannten Gruppen, die sich durch spezielle Reagenzien spalten lassen zum Beispiel Disulfide durch Hydrogenolyse oder durch Disulfidaustausch, Glykolgruppen mit Periodat (zum Beispiel bei der Weinsäure), Estergruppen mit Hydroxylamin; und

5 Enzymatisch spaltbaren Molekülen wie entsprechende Peptide, zum Beispiel die Sequenz Leu-Gly-Pro-Ala, die von Kollagenase gespalten werden kann, oder Oligosaccharide.

Besonders bevorzugte Beispiele sind reaktive Gruppen c) ausgewählt unter

10 mindestens einer Aminogruppe, Hydroxylgruppe, Thiol, Carbonsäure, Säurechlorid, Ketogruppe, Dicarbonsäureamid, 3-Maleinimidopropionsäure-N-succinimidylester und Succinimidylester.

Im Falle von PEG, das eine symmetrische Verbindung ist, ist die reaktive Gruppe c) von Hydroxyl unterschiedlich zu wählen.

15 Die Synthese der erfindungsgemäßen Blockcopolymere läßt sich prinzipiell auf verschiedenen Wegen bewerkstelligen, wobei gängige Methoden der Polymerchemie verwendet werden.

Zum einen können die Blöcke a) und b) separat synthetisiert und anschließend

20 kovalent gebunden werden. Alternativ dazu ist es möglich eine Polymerkette vorzulegen und die fehlende Kette durch Polymerisation an einem Polymerkettenende zu synthetisieren. So ist es zum Beispiel möglich, Blockcopolymere aus Poly(D,L-lactid) und Poly(ethylenglykol)-amin (PLA-PEG-NH₂) zu synthetisieren, indem man PEG-NH₂ vorlegt und die bioabbaubare PLA Kette

25 durch Ringöffnungspolymerisation aus Dilactid am Hydroxyende des PEG-NH₂ synthetisiert. Prinzipiell ist auch die umgekehrte Vorgehensweise möglich.

Die reaktive Gruppe c) kann hierbei wie im vorstehenden Beispiel im erhaltenen Polymer bereits vorhanden sein bzw. kann bei Bedarf eine in der hydrophilen

30 Komponente b) vorhandene funktionelle Gruppe für die Anbindung der erwünschten oberflächenmodifizierenden Substanz d) zu einer geeigneten reaktiven Gruppe c) umgesetzt oder eingeführt werden.

So kann das Blockcopolymer mit nukleophilen Gruppen modifiziert werden, indem ein mindestens bifunktionelles Molekül wie zum Beispiel Disuccinimidylsuccinat, an eine freie Endgruppe der Komponente b) gekoppelt wird.

- 5 Diese Reaktion kann im einfachsten Fall in Lösung stattfinden. Im Falle von PLA-PEG-NH₂ eignet sich zum Beispiel DMSO als Lösungsmittel. Die Reaktion kann auch nach der Verarbeitung des Blockcopolymer zum Beispiel zu einem geeigneten Formkörper an dessen Oberfläche stattfinden.
- Der Vorteil der Aktivierung mit einer reaktiven Gruppe c) besteht darin, dass die
- 10 Kopplung von vielen oberflächenmodifizierenden Substanzen d) in Wasser abläuft. Durch die reaktive Gruppe c), welche an den hydrophilen Block b) geknüpft wird, endet dieser Block mit einer aktiven Gruppe, die in der Lage ist, andere Moleküle mit nukleophilen funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel Aminogruppen, zu binden. Abbildung 1 stellt die Anheftung einer oberflächen-
- 15 modifizierenden Substanz an eine solche Polymeroberfläche schematisch dar.

Über die im Anschluss stattfindende Anheftung der oberflächenmodifizierenden Substanz d) an den hydrophilen Molekülteil b) kann dann die gewünschte Oberflächeneigenschaft eingestellt werden.

20

- Oberflächenmodifizierende Substanzen d), die für eine Bindung verwendbar sind, sind im allgemeinen solche, die eine nukleophile Gruppe – beispielsweise eine Aminogruppe – tragen, wie zum Beispiel: Kohlenhydrate, unter anderem Mono-, Oligo- und Polysaccharide und Glykoside, Peptide, Proteine,
- 25 Heteroglykane, Proteoglykane, Glykoproteine, Aminosäuren, Fette, Phospholipide, Glykolipide, Lipoproteine, Arzneistoffe, Antikörper, Enzyme, DNA / RNA, Zellen, die zum Beispiel über auf der Zellmembran befindliche Proteine direkt an das Blockcopolymer anbinden können, aber auch Farbstoffe und molekulare Sensoren.

30

Beispiele für Peptide sind solche mit dem Motiv -RGD-, IKVAV oder YIGSR und für Proteine Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel IGF, EGF, TGF, BMP und Basic FGF, Proteine und Glykoproteine der extrazellulären Matrix wie zum

Beispiel Fibronektin, Kollagen, Laminin, bone sialo protein und Hyaluronsäure. Weitere Substanzen sind in der einschlägigen Literatur beschrieben.

Das erfindungsgemäße Blockcopolymer eignet sich insbesondere zur Herstellung von drug targeting-Systemen, drug delivery-Systemen, Bioreaktoren, vorzugsweise porösen Formkörpern, für therapeutische und diagnostische Zwecke, für das tissue engineering und als Emulgator.

Nachstehend wird die Anbindung der oberflächenmodifizierenden Substanz allgemein und in bezug auf bevorzugte Anwendungen näher erläutert

Für die Anbindung kann das Blockcopolymer wie die Substanz in Lösung vorliegen oder das Blockcopolymer bildet eine immobilisierte feste Oberfläche, an die die in Lösung vorliegende Substanz d) bindet.

Entscheidender Vorteil der Verwendung des erfindungsgemäßen Blockcopolymers dabei ist, dass die Kopplungsreaktionen unter sehr milden Bedingungen auch im wässrigen Medium durchführbar sind und damit auch empfindliche Substanzen d) angebunden werden können.

So kann man Proteine bei Raumtemperatur und bei einem für das Protein geeigneten pH ohne Denaturierung an der Polymeroberfläche fixieren. Oder man kann Substanzen, die mittels Bestrahlung von Licht an die Oberfläche gebunden werden sollen, in einem beliebigen Lösungsmittel lösen, in welchem das Polymer unlöslich ist. Bei anschließender Bestrahlung mit UV-Licht kann dann die Bindung an die Oberfläche ebenfalls bei Raumtemperatur geknüpft werden.

Für eine Anbindung sind also prinzipiell mehrere Bedingungen denkbar, wobei durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Blockcopolymers genügend Freiheiten bestehen, in Bezug auf die Stabilität der Substanz d) und des Polymers optimale Bedingungen zu wählen.

Durch die erfindungsgemäß ermöglichte einfache Art der Anbindung von auch unveränderten, d.h. nicht aktivierten Substanzen d) an das Blockcopolymer mit reaktiver Gruppe c) kann das Verfahren soweit vereinfacht werden, dass es nur nötig ist, den fertig vorgeformten Polymerträger zum Beispiel als Mizellen,

Nanopartikel, Polymerfilm oder Polymerschwamm in die Lösung der Substanz d) zu tauchen, um dann nach einer vorgegebenen Reaktionszeit das fertig modifizierte System zu erhalten (Instantreaktion).

- Alternativ zur beschriebenen Anbindung der Substanz d) an das Polymer mit reaktiver Gruppe c) ist aber auch der umgekehrte Weg möglich, nämlich zuerst die anzubindende Substanz d) mit der reaktiven Gruppe c) für eine Bindung zu aktivieren, und dann den Komplex aus Substanz d) und reaktiver Gruppe c) über die reaktive Gruppe c) an die Komponente b) des Blockcopolymers aus Komponente a) und b) unter Ausbildung des fertigen oberflächenmodifizierten erfindungsgemäßen Blockcopolymers zu binden.

- Hierbei ist jedoch für von Nachteil, dass für eine Aktivierung der Substanz d) durch Anbindung der reaktiven Gruppe c) in aller Regel ein größerer Überschuß der reaktiven Gruppe c) hier zum Beispiel einer niedermolekularen Dicarbonsäure, erforderlich ist, um die Bildung von Dimeren zu verhindern. Dieser muß jedoch nach der Aktivierung wieder entfernt werden. Das hat zur Folge, dass sich, vor allem bei ebenfalls niedermolekularen Substanzen d), die Aufreinigung schwieriger gestaltet.

- Zusätzlich zur Herstellung von homogen belegten Oberflächen sind mit den erfindungsgemäßen Blockcopolymeren auch nicht homogen belegte Flächen einfach herzustellen. Das bedeutet, dass man beispielsweise Gradienten oder Muster (pattern) der oberflächenmodifizierenden Substanzen d) auf diesen Polymeren erzeugen kann. Das kann durch punktuelles Aufbringen der Substanzen d) (zum Beispiel mit einem Tintenstrahlverfahren) oder aber durch punktuelle Aktivierung der reaktiven Gruppen c) durch Bestrahlung (zum Beispiel mit UV-Licht), Beschuss mit Teilchen, Stempeln oder Soft Lithographie geschehen.

- So können strukturierte Oberflächen geschaffen werden, die es auch erlauben, beliebige Kombinationen von Substanzen d) zum Beispiel auf ihre Wirkung auf Zellen zu untersuchen bzw. um Kombinationen von Zellen in ganz spezieller räumlicher Orientierung zueinander zu züchten oder aber auch um mit Enzymen

biotechnologische Miniaturfabriken zu konstruieren, die in einem gekoppelten Verfahren spezielle Reaktionen durchführen. In Abbildung 3 sind solche Oberflächen dargestellt, die sich durch zwei unterschiedliche Substanzen d) und zudem noch einer inerten kürzeren Komponente auszeichnen.

5

Im Rahmen des tissue engineering ist es möglich die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen besser als bisher zu beeinflussen, da durch die erfindungsgemäßen Blockcopolymere eine exakte Belegung der Oberfläche mit einem oder mehreren Substanzen d) möglich ist. Gleichzeitig wird die
10 unspezifische Wechselwirkung von unerwünschten Substanzen d) insbesondere unerwünschten Zellen, mit den Polymeroberflächen unterdrückt.

Im Rahmen des drug delivery ist es möglich, die Polymere zur Oberflächenmodifizierung einzusetzen, welche kleine Polymerpartikel an
15 spezifische Gewebe oder Organe verteilt (drug targeting). Dies wird durch Bindung von spezifischen Substanzen d) wie zum Beispiel Plasmaproteinen, Antikörpern oder Lektinen erreicht. Weitere hierfür mögliche Substanzen d) sind in der einschlägigen Literatur beschrieben sind.

20 Eine weitere Anwendung besteht in der chemischen Bindung der Polymere in Form von Partikeln an Gewebe (bioadhäsive Systeme). Durch diese Anwendung kann ein Wirkstoff in erhöhter Konzentration an das Zielgewebe verteilt werden.

Durch den Polymerabbau ist zu erwarten, dass die am hydrophilen Polymerblock
25 b) angeheftete Substanz d) im Rahmen der Hydrolyse freigesetzt wird. Dieser dynamische Vorgang gestattet die zeitlich gesteuerte Veränderung der Oberflächeneigenschaften des erfindungsgemäßen Blockcopolymers.

Die erfindungsgemäßen Polymere lassen sich auch zu diagnostischen Zwecken
30 einsetzen, indem auf ihrer Oberfläche Substanzen d) gebunden werden, die mit den zu analysierenden Molekülen eine Bindung eingehen. Das Analysat kann dann zusammen mit dem Polymer (zum Beispiel über einen geeigneten Formkörper) von der Probe abgetrennt werden.

Zur näheren Veranschaulichung der Erfindung ist im folgenden die Herstellung eines erfindungsgemäßen Blockcopolymers sowie die anschließende Anbindung eines Proteins am Beispiel des PEG-PLAs dargestellt.

1. Beispiel: Herstellung von NH₂-PEG-PLA

a) Synthese von NH₂-PEG

Die Herstellung erfolgte nach Yokoyama, M. et al. Bioconjug.Chem.3 (1992) 275-276.

- 5 Die gewünschte Menge Ethylenoxid wurde bei -79°C (Trockeneis + Methanolbad) in getrocknetes THF in einem Dreihalskolben eingeleitet und darin gelöst. Die Ethylenoxidflasche wurde nach dem Einleiten zurückgewogen und damit die vorgelegte Menge Ethylenoxid bestimmt. Entsprechend des gewünschten Molekulargewichts des Polymers wurde nun die berechnete Menge
- 10 0,5M Lösung von Kalium-bis-(trimethylsilyl)-amid in Toluol aus einem Tropftrichter zugegeben.

- Das Reaktionsgemisch wurde dann bei 20°C in dem verschlossenen Dreihalskolben 36 Stunden gerührt. Die so erhaltene Polymerlösung wurde in die
- 15 12fache Menge an Ether getropft und das gefällte Polymer daraus abfiltriert. Nach Auflösen des erhaltenen Polymers in THF wurde eine kleine Menge 0,1N Salzsäure zugegeben und damit das Silylamid gespalten. Die so erhaltene Lösung des fertigen Endprodukts wurde 5 Min bei Raumtemperatur gerührt und erneut in Ether gegeben, um das reine Polymer zu präzipitieren.

20

b) Synthese von NH₂-PEG-PLA

Die Synthese erfolgte nach Kricheldorf, H.R. and Kreiser-Saunders, I. Macromol.Symp.103 (1996) 85-102; Leenslag, J.W. and Pennings, A.J. Makromol.Chem.188 (1987) 1809-1814.

- 25 Die Ausgangsprodukte der Synthese, das gemäß 1a) synthetisierte NH₂-PEG und cyclisches DL-Dilactid (3,6-Dimethyl-1,4-dioxan-2,5-dion), wurden in den gewünschten Gewichtsverhältnissen in je einen Rundkolben gegeben und in Toluol p.A. aufgelöst. Dazu wurden beide Kolben am Wasserabscheider erhitzt, um das noch im Toluol vorhandene Wasser zu entfernen. Die so erhaltenen
- 30 Lösungen wurden dann im Dreihalskolben vereinigt und unter permanentem Stickstoffstrom erneut erhitzt.

Zu dem siedendem Reaktionsgemisch wurde dann der abgewogene Katalysator (Zinn-2-ethylhexanoat) gegeben und dann das Gemisch 8 Stunden am Sieden gehalten.

Die so erhaltene Polymerlösung wurde nach dem Abkühlen in einen Rundkolben
5 überführt und dreimal mit Dichlormethan am Rotationsverdampfer bis zur Trockene abrotiert. Nach zweimaligem Abrotieren nach Zugabe von Aceton wurde das so erhaltene Polymer erneut in Aceton gelöst und in eisgekühltes demineralisiertes Wasser eingetopft und dadurch gefällt. Die so erhaltenen Polymerfäden wurden durch ein Filter abgetrennt und zum Trocknen in einen
10 Vakuumtrockenschrank gegeben. Die Bestimmung der Molekülmasse kann durch GPC erfolgen.

c) Synthese des Disuccinimidylesters der Weinsäure (DSWS)

Die Synthese erfolgte nach Anderson, G.W. et al. J.Am.Chem.Soc.86 (1964)
15 1839-1842.

Die berechneten Mengen Weinsäure und N-Hydroxysuccinimid wurden in einem Rundkolben in einer Mischung aus Dioxan und Ethylacetat (4:1) gelöst. Zu dieser Lösung wurde die Lösung des Katalysators (Dicyclohexylcarbodiimid) im gleichen Lösungsmittelgemisch gegeben und das Ganze bei 0°C 20h im Eisbad
20 gerührt. Der so erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Dioxan gewaschen. Aus diesem Niederschlag wurde das Endprodukt durch vorsichtiges Erwärmen mit Acetonitril extrahiert. Die so erhaltene Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und das Produkt im Vakuumschrank getrocknet.

25 d) Synthese von SWS-NH-PEG-PLA

Die gemäß 1c) und 1b) erhaltenen Ausgangsprodukte Disuccinimidylweinsäure und NH₂-PEG-PLA wurden mit einem leichten Überschuß des Diesters in Acetonitril gelöst und mit einigen Tropfen Triethylamin versehen. Nach kurzem Erhitzen zum Sieden wurde die Mischung für 24h gerührt. Das Endprodukt wurde
30 durch Abrotieren vom Acetonitril getrennt und in Aceton aufgelöst. Die so erhaltene Polymerlösung wurde in Wasser eingetropft und der Niederschlag

abfiltriert. Nach Trocknen im Vakuum steht das fertige aktive Polymer zur Verfügung.

Nach der vorstehend beschriebenen Vorgehensweise wurden für die nachstehenden Untersuchungen erfindungsgemäße NH_2 -PEG-PLA-Diblockcopolymere mit unterschiedlichen Molekülmassen für die Komponenten a) und b) hergestellt bzw. in analoger Weise mit Methylgruppen inaktivierte Polymere, bei denen die reaktive Gruppe c) durch eine Methylgruppe ersetzt war.

10

Beispiel 2

Herstellung von Amino-Polyethylenglycol-Poly-L-lactid (NH_2 -PEG-PLLA)

Es wurde im wesentlichen wie in Beispiel 1b) verfahren.

15 Jedoch wurde anstelle des cyclischen D,L-Dilactids das cyclische L-Dilactid eingesetzt.

Weiter wurde das erhaltene Polymer nach dem dreimaligen Abrotieren mit Dichlormethan erneut in Dichlormethan gelöst und in eisgekühlten Diethylether getropft. Die so erhaltenen Polymerfäden wurden durch ein Filter abgetrennt und zum Trocknen in einen Vakuumtrockenschrank gegeben.

20

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte durch GPC und die des anzahlmittleren Molekulargewichts auch durch ^1H -NMR über die Berechnung der Integrale erfolgen.

25 Beispiel 3

Anknüpfung von oberflächenmodifizierenden Substanzen d)

Die Anbindung von oberflächenmodifizierenden Substanzen kann nach in Hill, M. et al. FEBS Lett.102 (1979) 282-286; Schulman, L.H. et al. Nucleic.Acids.Res.9 (1981) 1203-1217 beschriebenen Verfahren erfolgen.

30

Die Anknüpfung der oberflächenmodifizierenden Substanzen d) an das nach Beispiel 1 erhaltene erfindungsgemäße Blockcopolymer kann prinzipiell auf zwei Weisen geschehen. Zum einen ist es möglich, die Substanz d) und das Blockcopolymer in Lösung zu verbinden, wenn die Substanz d) die nachfolgenden Verarbeitungsschritte unbeschadet übersteht. Oder zum anderen kann erst das Blockcopolymer zu der gewünschten Form verarbeitet und dann erst die Substanz d) angeknüpft werden. In beiden Fällen sollte durch Pufferung sichergestellt werden, dass zum Beispiel eine Aminogruppe unprotoniert vorliegt, um möglichst quantitative Ausbeuten zu erhalten. Mit einer Pufferung kann zudem noch der Ort der Anbindung an die Substanz d) gesteuert werden, wenn man den pH so wählt, daß zum Beispiel nur eine Aminogruppe unprotoniert vorliegt.

Beispiel 4

15 Charakterisierung von Polymerfilmen – Eigenschaften der Blockcopolymere

4a) Untersuchung der Blockcopolymere mit AFM

Zur Charakterisierung der Oberflächentopographie der erfindungsgemäßen Blockcopolymere wurde die Rasterkraftmikroskopie verwendet. Dazu wurden die Polymere in einer 5%igen Lösung in Chloroform mittels Spincasting auf quadratische Metallplättchen (5x5mm) aufgebracht und anschließend getrocknet. Die so erhaltenen Filme wurden dann mit AFM untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 gezeigt:

Was man erhält, sind je nach untersuchtem Polymer unterschiedliche Dichten buckliger Erhebungen auf der Polymeroberfläche. Bei den Erhebungen handelt es sich um Kristallite des Polyethylenglykols, die mit ansteigendem Gehalt an Polyethylenglykol im Blockcopolymer zunehmen. Das heißt, die Polymere zeichnen sich aus durch eine Phasentrennung der Blöcke und damit einer Verfügbarkeit der hydrophilen Ketten an der Polymeroberfläche.

30

4b) Untersuchung der Proteinadsorption

Die Untersuchung der Proteinadsorption und deren Unterdrückung erfolgte an verschiedenen erfindungsgemäßen PEG-PLA-Blockcopolymeren, die anstelle einer reaktiven Gruppe c) eine Methylgruppe enthielten und somit für die Proteinanbindung inaktiviert waren.

5

Zur Untersuchung der Adsorption von Proteinen an die Polymerfilme wurden derartige inaktive Polymere auf Metallplättchen (0,5x0,5 cm) ausgegossen und intensiv getrocknet (mindestens 2 Tage im Vakuum), die so erhalten Filme wurden dann mit den zu untersuchenden Proteinlösungen inkubiert und nach
10 mehrmaligem Abwaschen mit phosphatgepufferter (pH=7,4) isotoner Kochsalzlösung abgewaschen. Die so erhaltenen Filme wurden dann erneut getrocknet und mit ESCA vermessen.

Als Modellsbstanzten wurden foetales Rinderserum, atriales natriuretisches
15 Peptid und Lachs-Calcitonin eingesetzt.

Die ESCA Spektren dienten zur Quantifizierung des adsorbierten Proteins bzw. Peptids, da durch die Aminosäuren des adsorbierten Proteins nun auch Stickstoff auf der Polymeroberfläche zu finden ist. Als Vergleich wurden
20 Polymerfilme aus reiner Polymilchsäure sowie nicht inkubierte Polymerfilme verwendet.

Die Ergebnisse sind in Abbildungen 5 und 6 gezeigt.

Es wird eine von der Art der jeweiligen verwendeten oberflächenmodifizierenden
25 Substanz d) abhängige Unterdrückung der Adsorption beobachtet.

So wird die Adsorption von fötalem Rinderserum durch Einbringen einer hydrophilen Kette im Rahmen der Messgenauigkeit vollständig unterdrückt (siehe Abbildung 5). Bei den Modellpeptiden Calcitonin und atrialen natriuretischen Peptid (ANP) ist teilweise noch eine geringe Adsorption von Peptid zu
30 identifizieren (siehe Abbildung 6).

Im Ergebniss kann somit festgestellt werden, dass die erfindungsgemäßen Blockcopolymere die Adsorption von Proteinen und Peptiden zu steuern

vermögen und damit Einfluss nehmen können auf das Verhalten von Zellen, die mit der modifizierten Polymeroberfläche in Kontakt kommen.

Beispiel 5

5 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens gegenüber Zellen

5a) Zellen aus einer Präadipozytenzelllinie wurden in einer Suspension auf ausgegossene Filme aus unterschiedlichen Polymeren gegeben und ihre
10 Adhäsion nach 5 und nach 24 Stunden beurteilt. Dazu wurden die Suspensionen vor dem Mikroskopieren mit Puffer abgewaschen, und somit nur die fest adhärierten Zellen beobachtet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 gezeigt.

Was man erkennen kann, sind Unterschiede im Zellverhalten je nachdem welche
15 Polymere verwendet wurden. So kann man beispielsweise auf dem MePEG₅PLA₂₀ sowohl nach 5 als auch nach 24 Stunden keine adhärierten Zellen erkennen, wobei auf dem Blockcopolymer MePEG₂PLA₂₀ mit der kürzeren PEG-Kette im geringen Ausmaß Zellen zu erkennen sind, die jedoch im Vergleich zur Probe aus lipophiler Polymilchsäure nur schlecht adhärieren. Man findet hier
20 nach 5 Stunden nur locker gebundene Zellaggregate und erst nach 24 Stunden vereinzelt schon gespreitete, d.h. fester gebundene Zellen.

Im Ergebnis ist jedoch festzuhalten, dass die erfindungsgemäßen Blockcopolymere die Adhäsion von Zellen unterdrücken bzw. reduzieren können und somit unspezifische Wechselwirkungen verhindern oder gering halten
25 können.

5b) Zur Untersuchung der Adhäsion von Stammzellen von Ratten wurden dünne Polymerfilme aus unterschiedlichen mit Methyl inaktivierten erfindungsgemäßen Blockcopolymere (Me-PEG₂-PLA₂₀, ME-PEG₂-PLA₄₀ und Me-PEG₅-PLA₄₅) und
30 zum Vergleich aus PLA, TCPS (Tissue Culture Polystyrol) sowie RG756 (einer Marke für Poly(D,L-Lactid-co-glykolid 75:25) auf Polypropylenscheiben ausgegossen. Auf diese Filme wurden dann die Knochenmarksstammzellen von 6 Wochen alten männlichen Sprague Dawley Ratten mit einer Dichte von 5000

Zellen pro cm^2 ausgesät. Nach 3 Stunden wurde dann die Morphologie der adhärenierten Zellen mit dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

- 5 Die Anzahl der Zellen wurde zusätzlich durch Auszählen mit dem Lichtmikroskop ermittelt.

Es zeigte sich, dass auf den erfindungsgemäßen Blockcopolymeren die Zellzahl umso geringer war, je größer die hydrophile Komponente b) des Polymers war.

- Des weiteren zeigten die Rasterelektronenmikroskopischen Bilder, dass
10 gegebenenfalls auf den erfindungsgemäßen Blockcopolymeren adhärenierte Zellen abgerundeter als auf den Vergleichspolymeren aus nur hydrophoben Bestandteilen waren, was ein deutliches Zeichen für die geringe Adhäsionsneigung der Zellen an die Polymeroberfläche ist.

15 **Beispiel 6**

Charakterisierung der aktiven Polymere hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeiten

6a) Nachweis der Bindungsfähigkeit mit einfachen Modellsubstanzen mit Aminogruppe in Lösung

- 20 Zur Untersuchung der Reaktivität in Lösung wurde eine bestimmte Menge Polymer (SWS-NH-PEG₂-PLA₂₀) (50 mg) in 2000 μl Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit einer bestimmten Menge Farbstoff (EDANS, 5-((2-aminoethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure, Natrium Salz, 0,1 – 4 mg), der ebenfalls in DMF gelöst war, versetzt. Um mögliche Protonierungen der
25 Aminogruppe auszuschließen wurden 20 μl Triethylamin als Protonenfänger zugegeben. Die so erhaltene Lösung wurde dann über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert. Nach der Reaktionszeit wurden dann 200 μl der Lösung mit 1800 μl Chloroform verdünnt und der überschüssige ausfallende Farbstoff durch Filtration abgetrennt. 200 μl der klaren Lösungen wurden dann mittels
30 Gelpermeationschromatographie vermessen. Die Menge an kovalent gebundenem Farbstoff wurde über die Zunahme der UV-Absorption bei 335 nm bestimmt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 9 gezeigt.

- Wertet man die erhaltenen Flächen aus, so erhält man ein Diagramm, bei dem man mit steigender Farbstoffmenge einen Anstieg der Peakfläche beobachten kann. Ab einer bestimmten Farbstoffmenge erhält man dann ein Plateau, was durch die beschränkte Anzahl an reaktiven Gruppen bedingt ist. Über diese
- 5 Bestimmung lässt sich einfach die Menge reaktiver Gruppen in einer Polymercharge bestimmen.

6b) Nachweis der Bindungsfähigkeit mit einfachen Modellsubstanzen mit Aminogruppe an festen Polymeroberflächen

- 10 Die Aktivität an festen Oberflächen kann ebenso wie die Aktivität in Lösung untersucht werden.

Dazu wurden Filme eines erfindungsgemäßen aktiven Blockcopolymers (SWS-NH-PEG₂-PLA₂₀), die auf runde Glasdeckgläser ausgegossen waren, mit einer wässrigen Lösung des Farbstoffs (5-Aminoeosin) überschichtet und diese

15 Lösung dann zwei Stunden einwirken gelassen. Die so erhaltenen markierten Filme wurden mehrmals mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend getrocknet. Die getrockneten Filme wurden dann in Chlorform gelöst und dann mittels GPC gegebenenfalls adsorbierter von kovalent gebundenem Farbstoff abgetrennt.

- 20 Beobachtet wurde das Vorhandensein einer erhöhten UV-Absorption bei dem Molekulargewicht der Polymere. Diese UV-Absorption ist zu erklären durch eine kovalente Verbindung zwischen Farbstoff und Polymer.

6c) Anbindung von Proteinen

- 25 Zur Untersuchung der Fähigkeit auch komplexere Verbindungen wie Proteine zu binden, wurde das Enzym Trypsin als Modellsubstanz verwendet.

Zur Anbindung des Enzyms an Polymerfilme wurden auf runden Glasdeckgläsern ausgegossene Filme der unterschiedlichen Polymere (SWS-NH-PEG₂-PLA₂₀ und zum Vergleich PLA) mit Lösungen des Enzyms Trypsin in

30 phosphatgepufferter isotoner Kochsalzlösung (PBS-Puffer) inkubiert. Die hierzu verwendeten Konzentrationen des Enzyms betrugen 0,5 bzw. 1,0 mg/ml.

Die so erhaltenen Trypsin gekoppelten Polymere wurden dann nach 2 Stunden Inkubationszeit mit 0,05% Tween 20 enthaltenen PBS-Puffer 3 mal gewaschen,

um gegebenenfalls adsorbiertes Protein so gut wie möglich zu entfernen. Die so gewaschenen Filme wurden dann trocken getupft und in Sixwellplates überführt. In die einzelnen Wells der Platten wurde dann jeweils 2 ml des Reaktionsmediums zugegeben und die enzymatische Reaktion bei 37°C für 2
5 Stunden im Inkubator durchgeführt. Bei dem Reaktionsmedium handelte es sich um eine 1 millimolare Lösung von Benzoyl-L-Argininethylester (BAEE) in Tris – Puffer mit pH = 8,0. Nach 2 Stunden wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe einer wässrigen Lösung eines Trypsininhibitors aus Sojabohnen gestoppt und damit die Umwandlung des Enzymsubstrats beendet. Die so
10 erhaltenen Lösungen wurden dann bei 253 nm UV-photometrisch vermessen.

Das Ergebnis ist in Abbildung 10 gezeigt:

Der Vergleich mit PLA und mit den reinen Glasdeckgläsern zeigt einen deutlichen Anstieg der Substratumsetzung im Falle des erfindungsgemäßen
15 Blockcopolymers, die durch die Menge an kovalent gebundenem Enzym bedingt ist.

Ansprüche

1. Blockcopolymer enthaltend
ein hydrophobes bioabbaubares Polymer,
5 ein hydrophiles Polymer,
mindestens eine reaktive Gruppe für die kovalente Anbindung einer
oberflächenmodifizierenden Substanz d) an das hydrophile Polymer b),
wobei die mindestens eine reaktive Gruppe c) ausgewählt ist unter 1)
einer funktionellen Gruppe und/oder 2) einem mindestens bifunktio-
10 nellen Molekül mit mindestens einer freien funktionellen Gruppe, mit
der Maßgabe, dass wenn das hydrophile Polymer b) Polyethy-
lenglykol ist die reaktive Gruppe c) nicht Hydroxyl ist.
2. Blockcopolymer nach Anspruch 1,
15 **dadurch gekennzeichnet,**
dass das hydrophobe Polymer a) und/oder hydrophile Polymer b) aus-
gewählt sind unter einem linearen und/oder verzweigten Polymer.
3. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
dass das hydrophobe Polymer a) mindestens ein Polymer ausgewählt
unter Polyester, Poly- ϵ -caprolacton, Poly- α -hydroxyester, Poly- β -
hydroxyester, Polyamid, Polyphosphazen, Polyanhydrid, Polydioxanon,
Polyäpfelsäure, Polyweinsäure, Polyorthoester, Polycarbonat, Peptid,
25 Polysaccharid und Protein ist.
4. Blockcopolymer nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophobe Polymer a) mindestens ein Polymer ausgewählt
30 unter Polylactid, Polyglykolid, Poly(lactid-co-glykolid), Poly- β -hydroxybuty-
rat und Poly- β -hydroxyvalerat ist.

5. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophile Polymer b) mindestens ein Polymer ausgewählt unter Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polyethylenglykol/Polypropylen-
5 glykol-Copolymer, Polyethylenglykol/Polypropylenglykol/ Polyethylenglykol-Copolymer, Polybutylenglykol, Polyacrylamid, Polyvinylalkohol, Polysaccharid, Peptid und Protein ist.
6. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
10 **dadurch gekennzeichnet,**
dass die reaktive Gruppe c) mindestens eine ausgewählt unter einer Aminogruppe, Thiol, Carbonsäure, Ketogruppe, einem Säurechlorid, Dicarbonsäureamid, 3-Maleinimidopropionsäure-N-succinimidylester und Succinimidylester ist.
- 15 7. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophobe Polymer a) mindestens eines ausgewählt unter Polylactid, Polyglykolid und Poly(lactid-co-glykolid) ist.
- 20 8. Blockcopolymer nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophile Polymer b) Polyethylenglykol ist.
- 25 9. Blockcopolymer nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Polyethylenglykol eine Molmasse in einem Bereich von 200 bis 10,000 Da aufweist.

10. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass das hydrophobe Polymer a) Polylactid vorzugsweise mit einer
5 Molmasse in einem Bereich von 1,000 bis 100,000 Da ist.
11. Blockcopolymer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Oberfläche des Blockcopolymers durch Anbindung
10 oberflächenmodifizierender Substanzen d) chemisch strukturiert ist.
12. Blockcopolymer nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Blockcopolymer zusätzlich mindestens eine
15 oberflächenmodifizierende Substanz d) enthält, wobei die Substanz d) über
die reaktive Gruppe c) mit dem hydrophilen Polymer b) verbunden ist.
13. Blockcopolymer nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
20 **dass** die Substanz d) mindestens eine Substanz ausgewählt unter einem
Kohlenhydrat, Peptid, Protein, Heteroglykan, Proteoglykan, Glykoprotein,
Aminosäure, Fett, Phospholipid, Glykolipid, Lipoprotein, Arzneistoff, Anti-
körper, Enzym, DNA / RNA, einer Zelle, Farbstoff und molekularen Sensor.
- 25 14. Formkörper gebildet aus einem Blockcopolymer nach einem der
Ansprüche 1 bis 13.
15. Formkörper nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
30 **dass** der Formkörper ein Film, Partikel, dreidimensionaler Körper, poröser
Körper oder ein Schwamm ist.

16. Verwendung eines Blockcopolymers nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung von drug targeting-Systemen, drug delivery-Systemen, Bioreaktoren, für therapeutische und diagnostische Zwecke, für das tissue engineering und als Emulgator.
- 5
17. Verfahren zur Herstellung eines Blockcopolymers nach einem der Ansprüche 12 oder 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass die mindestens eine Substanz d) mit einem Blockcopolymer nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Blockcopolymer in Lösung oder
10 in der Festphase vorliegt, umgesetzt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
15 **dass** für die Anbindung der mindestens einen Substanz d) das Blockcopolymer nach einem der Ansprüche 1 bis 11 in Form eines porösen Formkörpers eingesetzt wird.
19. Verfahren zur Herstellung eines Blockcopolymers nach einem der Ansprüche 12 oder 13 oder nach einem der Ansprüche 17 oder 18,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
dass in einer ersten Stufe die Substanz d) mit einer reaktiven Gruppe c) versehen wird und in einer zweiten Stufe der Komplex aus Substanz d) und reaktive Gruppe c) über die reaktive Gruppe c) an das hydrophile Polymer
25 b) eines Blockcopolymers aus einem hydrophoben Polymer a) und einem hydrophilen Polymer b) gebunden wird.

20. Verfahren zur Herstellung eines Blockcopolymers nach einem der Ansprüche 12 oder 13 oder 17 bis 19,
dadurch gekennzeichnet,
5 **dass** die Anbindung der mindestens einen Substanz d) an die Oberfläche des Blockcopolymers unter Erzeugung eines Substratmusters erfolgt.
21. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
10 **dass** die Substanz d) mit örtlich konstanter oder variabler Dichte über die reaktive Gruppe c) auf der Oberfläche eines Blockcopolymers enthaltend eine hydrophobe Komponente a) und hydrophile Komponente b) aufgebracht wird.
- 15 22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass für die Aufbringung der reaktiven Gruppe c) und/oder der Substanz d) in einem Substratmuster die Oberfläche des Blockcopolymers durch einen Plotter, einen Tintenstrahldrucker, Bestrahlung mit Licht, Beschuss
20 mit Teilchen, Stempeln oder Soft Lithographie strukturiert wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08G63/664 C08G81/00 A61L27/18 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08G A61L A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 844 269 A (KATAOKA KAZUNORI) 27 May 1998 (1998-05-27) claims 1-10	1-19
X	WO 95 03356 A (GREF RUXANDRA ; DOMB ABRAHAM J (IL); PERACCHIA MARIA TERESA (IT); M) 2 February 1995 (1995-02-02) claims 1-42	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 November 2000

Date of mailing of the international search report

30/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Decocker, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06313

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0844269 A	27-05-1998	AU 6631096 A	05-03-1997
		BR 9610053 A	06-07-1999
		CA 2229068 A	20-02-1997
		CN 1192759 A	09-09-1998
		HU 9900662 A	28-06-1999
		WO 9706202 A	20-02-1997
		NO 975584 A	03-12-1997
		SI 9620107 A	31-10-1998
		US 5929177 A	27-07-1999
WO 9503356 A	02-02-1995	US 5565215 A	15-10-1996
		US 5543158 A	06-08-1996
		US 5578325 A	26-11-1996
		CA 2167920 A	02-02-1995
		CA 2167921 A	02-02-1995
		EP 0710261 A	08-05-1996
		EP 0712421 A	22-05-1996
		JP 9504308 T	28-04-1997
		JP 9504042 T	22-04-1997
		WO 9503357 A	02-02-1995

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06313

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C08G63/664 C08G81/00 A61L27/18 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C08G A61L A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 844 269 A (KATAOKA KAZUNORI) 27. Mai 1998 (1998-05-27) Ansprüche 1-10	1-19
X	WO 95 03356 A (GREF RUXANDRA ; DOMB ABRAHAM J (IL); PERACCHIA MARIA TERESA (IT); M) 2. Februar 1995 (1995-02-02) Ansprüche 1-42	1-19

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30/11/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Decocker, L

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06313

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum d r Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0844269 A	27-05-1998	AU 6631096 A	05-03-1997
		BR 9610053 A	06-07-1999
		CA 2229068 A	20-02-1997
		CN 1192759 A	09-09-1998
		HU 9900662 A	28-06-1999
		WO 9706202 A	20-02-1997
		NO 975584 A	03-12-1997
		SI 9620107 A	31-10-1998
		US 5929177 A	27-07-1999
WO 9503356 A	02-02-1995	US 5565215 A	15-10-1996
		US 5543158 A	06-08-1996
		US 5578325 A	26-11-1996
		CA 2167920 A	02-02-1995
		CA 2167921 A	02-02-1995
		EP 0710261 A	08-05-1996
		EP 0712421 A	22-05-1996
		JP 9504308 T	28-04-1997
		JP 9504042 T	22-04-1997
		WO 9503357 A	02-02-1995